

VERIFICATION OF TRANSLATION



I, Nicoletta IAIA, of Via Vincenzo Bellini 20 – 00198 Rome – Italy, am the translator of the document MI99A001783 herewith attached and I state that the following is a true and correct translation to the best of my knowledge and belief.

Rome, May 25<sup>th</sup> 2006

Nicoletta IAIA



BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT



# MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

IT00/00321



|                   |
|-------------------|
| REC'D 28 NOV 2000 |
| WIPO PCT          |

4

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI99A001783 DEL: 06.08.1999

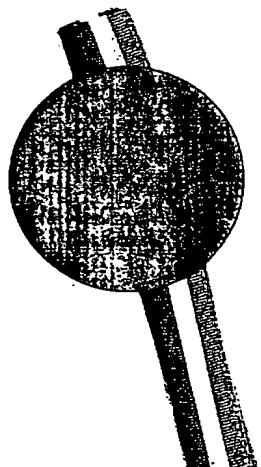
*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accusato processo verbale di deposito*

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il 20 OTT. 2000

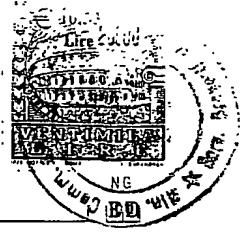
IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

P. V. dr. Paolo Gallorro



AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA  
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati  
Residenza TRIESTE codice 80035060328

2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Diego Pallini ed altri cod fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza Notarbartolo & Gervasi S.p.A.  
via C.so di Porta Vittoria n 9 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

D. TITOLO classe proposta (sez/cl/scl) C12N gruppo/sottogruppo 1/1/1  
Animali transgenici non umani anti-NGF.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI  NO

SE ISTANZA DATA 11/11/11 N° PROTOCOLLO 111111

E. INVENTORI DESIGNATI cognome nome

cognome nome

1) Cattaneo Antonino 3) Ruberti Francesca  
2) Capsoni Simona 4) \_\_\_\_\_

F. PRIORITÀ

| nazione o organizzazione | tipo di priorità | numero di domanda | data di deposito | allegato S/R |
|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------|
| 1) <u>Nessuna</u>        |                  |                   |                  |              |
| 2)                       |                  |                   |                  |              |

SCIOLGIMENTO RISERVE  
Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI  
Nessuna



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| N es   | Doc. 1) <input checked="" type="checkbox"/> PROV | n pag <u>144</u>   | riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) |
| Doc. 2) <input checked="" type="checkbox"/> PROV | n tav <u>17</u>                                  | disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) |   |
| Doc. 3) <input checked="" type="checkbox"/> RIS  |  | lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale   |   |
| Doc. 4) <input checked="" type="checkbox"/> RIS  |  | designazione inventore                                       |   |
| Doc. 5) <input checked="" type="checkbox"/> RIS  |  | documenti di priorità con traduzione in italiano             |   |
| Doc. 6) <input checked="" type="checkbox"/> RIS  |  | autorizzazione o alto di cessione                            |   |
| Doc. 7) <input checked="" type="checkbox"/> RIS  |  | nominativo completo del richiedente                          |   |

SCIOLGIMENTO RISERVE  
Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
confronta singole priorità  
\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

8) alieslab di versamento, totale lire Novecentoquindicimila.=

obbligatorio

COMPILATO IL 06/08/1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) Diego Pallini

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO codice 115  
VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI99A 001783 Reg A

L'anno millenovcento NOVANTANOVE, il giorno 1, del mese di AGOSTO

Il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata di n 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE Dr. Diego Pallini  
timbro dell'Ufficio \_\_\_\_\_

L'UFFICIALE ROGANTE

E. GATTI

1904PTIT

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA  REG A

DATA DI DEPOSITO

NUMERO BREVETTO  DATA DI RILASCIO

05/06/1998

D. TITOLO

Animali transgenici non umani anti-NGF.

L. RIASSUNTO

Nella presente invenzione viene descritto un animale transgenico non umano, che esprime ubiquitariamente un anticorpo neutralizzante anti-NGF. Viene inoltre descritto il metodo di preparazione dell'animale transgenico e l'utilizzo di questo modello di knockout fenotipico, per la valutazione degli effetti pleiotropici dell'NGF. Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda l'uso del topo transgenico come modello animale per le sindromi neurodegenerative, associate o meno a patologie muscolari, quali la malattia di Alzheimer, ed il suo uso per la selezione di composti in grado di bloccare la degenerazione neuronale o la perdita di funzionalità muscolare. Un ulteriore aspetto della presente invenzione è riferito all'uso locale di NGF per la correzione di patologie muscolari e del deficit colinergico a livello cerebrale.

M. DISEGNO



1904PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"Animali transgenici non umani anti-NGF"

a nome di: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

con sede in: Trieste

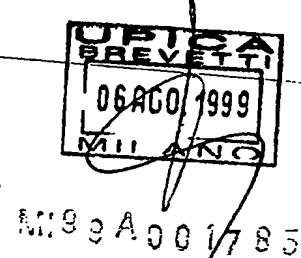
inventori designati: Cattaneo Antonino, Capsoni Simona,

Ruberti Francesca

depositata il

con il n.

\*\*\*



#### Stato dell'arte

Il Nerve Growth Factor (NGF) (Levi-Montalcini, 1952) è una neurotrofina pleiotropica che esercita un ruolo fondamentale nel differenziamento neuronale, sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico. L'NGF risulta infatti indispensabile per il differenziamento dei neuroni colinergici del telencefalo basale, dei neuroni sensitivi e di quelli del sistema nervoso simpatico.

Sembra ora essere chiaro che l'NGF è necessario anche in fasi successive al differenziamento, in quanto in grado di regolare i fenomeni di apoptosi cellulare (Davies, 1992), la sintesi di elementi del citoscheletro durante la rigenerazione dell'assone (Snider, 1989), la sintesi di neurotrasmettitori peptidici ed enzimatici (Eide et al., 1993), il riarrangiamento sinaptico e la proliferazione neuronale (Schnell et al., 1994) e che giochi quindi un ruolo cruciale anche nei processi neurodegenerativi e nell'invecchiamento neuronale (Connor & Dragunow, 1998).

I meccanismi di azione che regolano attività così diverse, rimangono

ancora da chiarire: l'azione pleiotropica dell'NGF e la mancanza di modelli animali adulti non permettono di correlare la sua espressione ad un solo e definito fenotipo o ad una determinata e riconoscibile funzione. L'inattivazione dell'NGF in modelli animali adulti, è stata tentata mediante diversi approcci tra i quali l' "immunoneutralizzazione" con il "delivery" sistematico di anticorpi neutralizzanti anti-NGF (Levi-Montalcini et al., 1960) o mediante il knockout del gene in topi transgenici (Crowley et al., 1994). Tuttavia i risultati sono stati in entrambi i casi piuttosto deludenti, in quanto nel primo approccio gli anticorpi forniti sistematicamente non superano la barriera ematoencefalica, e l'effetto di neutralizzazione dell'NGF negli altri distretti dipende da troppi altri fattori poco standardizzabili quali l'affinità e il titolo anticorpale, la velocità di clearance o la cross-reactività dell'anticorpo con altre neurotrofine, ecc. D'altra parte, l'approccio di inattivazione molecolare in topi knockout ha permesso di confermare l'importanza di questa neurotrofina e la non ridondanza del suo sistema di signalling intracellulare, ma ha mancato di fornire il modello adulto atteso per lo studio dell'NGF: infatti i topi transgenici  $ngf^{-/-}$  muoiono poco dopo la nascita prima di un eventuale sviluppo di patologie degenerative. Anche il fenotipo di topi eterozigoti  $ngf^{+/-}$  è risultato poco utile allo studio delle patologie associate alla mancanza di NGF nell'adulto: il topo eterozigote ha un livello di NGF solo del 25% inferiore al controllo, presenta un fenotipo solo debolmente colinergico, senza anomalie evidenti e correlabili con patologie neurodegenerative umane.

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono tuttavia che l'NGF rivesta

un ruolo chiave in sindromi neurodegenerative (Connor & Dragunow, 1998).

La demenza senile e la malattia di Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) sono sindromi neurodegenerative caratterizzate da demenza progressiva. La malattia di Alzheimer colpisce il 5% delle persone intorno ai 70 anni e più del 30% delle persone intorno agli 80 anni. La sua incidenza, in relazione al miglioramento delle condizioni di vita ed al prolungamento dell'età media, è destinata a raddoppiare nei prossimi trenta anni. I costi sociali di tale patologia sono elevatissimi.

La malattia di Alzheimer colpisce dapprima i neuroni della corteccia cerebrale ed è caratterizzata sia da sintomi clinici (come per esempio, la perdita progressiva delle capacità cognitive) sia da caratteristici segni patologici (che possono essere diagnosticati solo post-mortem) come la formazione di placche extracellulari di proteina  $\beta$ -amiloide, aggregazioni intracellulari neurofibrillari, costituite da proteina tau iperfosforilata, e "perdita neuronale" (Goedert, 1993; Mandelkow e Mandelkow, 1993; Selkoe, 1994).

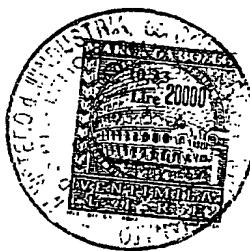
La malattia di Alzheimer è associata inoltre a disturbi motori dovuti sia alla perdita delle capacità cognitive e di coordinazione, sia a patologie proprie del muscolo scheletrico come la deposizione di amiloide nelle cellule muscolari scheletriche (Fukuchi et al., 1998; Jin et al., 1998). E' interessante notare a questo proposito che l'NGF esercita una funzione anche su cellule non neuronali, osservazione che trova conferma nella presenza di recettori per l'NGF a bassa e ad alta affinità (p75, TrkA) anche su cellule muscolari e dal ritrovamento di isoforme diverse del

recettore TrkA apparentemente non espresse nel sistema nervoso.

Nel sistema nervoso centrale, il sistema colinergico è particolarmente colpito. Si riscontra una diminuzione della sintesi di acetilcolina da parte dei neuroni colinergici del telencefalo basale ed una perdita selettiva di tali neuroni. I neuroni colinergici sono dipendenti dall'NGF che agisce attraverso i recettori ad alta (TrkA) e a bassa affinità (p75).

Nonostante gli enormi investimenti effettuati da strutture pubbliche e soprattutto private, non esiste a tutt'oggi una diagnosi precoce, né una terapia adeguata. Ciò è dovuto, soprattutto, alla mancanza di modelli sperimentali cellulari o animali che riproducano in modo completo le strutture neuropatologiche aberranti.

Negli ultimi anni sono stati proposti diversi modelli transgenici per la definizione dell'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer e per la selezione di composti utili nella terapia della malattia. A partire dall'osservazione delle caratteristiche istologiche, immunologiche e molecolari della malattia di Alzheimer, quali la presenza di depositi di proteina  $\beta$ -amiloide nel sistema nervoso centrale, in particolare a livello della corteccia cerebrale e nell'ippocampo, sono stati costruiti animali transgenici in cui il precursore della proteina  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ PP) wild-type viene espresso a livelli superiori a quelli endogeno, o viene espresso in forma mutata con mutazioni riscontrate nelle forme genetiche della malattia (Hsiao WO 97/87492 e Games, WO 96/40896). Altri modelli transgenici proposti riguardano animali in cui il transgene è la presenilina-1 o 2 (Citron et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997) da sola o insieme con il precursore della proteina amiloide (Amyloid



Precursor Protein = APP) (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Wong et al., 1999), la proteina tau (Gotz et al., 1995; Brion et al., 1999) o il frammento C-99 della proteina bPP (Jin et al., 1998).

Tutti i modelli finora proposti tuttavia, sviluppano solo alcuni dei marker morfologici, istologici, o molecolari definiti come caratteristici per la diagnosi della malattia di Alzheimer e non rappresentano pertanto dei modelli completi.

#### **Sommario dell'invenzione**

Nella presente invenzione viene descritto un animale transgenico non umano che esprime ubiquitariamente un anticorpo neutralizzante anti-NGF. Viene inoltre descritto il metodo di preparazione dell'animale transgenico ed l'utilizzo di questo modello di knockout fenotipico, per la valutazione degli effetti pleiotropici dell'NGF. Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda l'uso del topo transgenico come modello animale per le sindromi neurodegenerative, associate o meno a patologie muscolari, quali la malattia di Alzheimer, ed il suo uso per la selezione di composti in grado di bloccare la degenerazione neuronale o la perdita di funzionalità muscolare. Un ulteriore aspetto della presente invenzione è riferito all'uso locale di NGF per la correzione di patologie muscolari e del deficit colinergico a livello cerebrale.

#### **Descrizione dettagliata dell'invenzione**

La presente invenzione descrive un animale transgenico non umano, che esprime un anticorpo neutralizzante anti-NGF (Nerve Growth Factor).

L'anticorpo utilizzato ( $\alpha$ D11) lega l'NGF in corrispondenza di un epitopo

critico per il legame con il suo recettore ad alta affinità, TrkA, bloccandone il legame e risulta quindi essere un anticorpo neutralizzante. L'epitopo riconosciuto dall'anticorpo  $\alpha$ D11 (corrispondente agli aminoacidi 41-49 dell'NGF) corrisponde ad una sequenza poco conservata nella famiglia delle neurotrofine, ed è quindi specifico di questo fattore di crescita. Alternativamente possono essere utilizzati anticorpi che sono in grado di bloccare il "signalling" intracellulare. Alternativamente l'anticorpo ricombinante può essere nella forma Fab, Fv o single chain Fv.

Sorprendentemente si è ora trovato che topi transgenici per anticorpi anti-NGF, che non esprimono apprezzabili livelli di anticorpo nell'immediato periodo postnatale e che esprimono tale anticorpo a livelli compresi tra 50 e 500 ng/ml nel periodo adulto, sviluppano un complesso quadro patologico, le cui principali caratteristiche sono:

- 1) distrofia muscolare, particolarmente a livello degli arti posteriori,
- 2) dilatazione dei ventricoli cerebrali, segno che viene spesso utilizzato in clinica come indice di malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer (Luxenberg et al., 1987)
- 3) atrofia della corteccia cerebrale associata in qualche caso alla totale scomparsa dell'ippocampo,
- 4) perdita di neuroni e/o apoptosis, segno posto in relazione alla malattia di Alzheimer (Mizutani et al., 1990),
- 5) deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel SNC, a livello della corteccia paracingolare e del neostriato,
- 6) deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel muscolo scheletrico,

- 7) deficit cognitivi caratterizzati da difetti nella "working memory" e deficit di orientamento spaziale,
- 8) deficit colinergico,
- 9) iperfosforilazione della proteina tau a livello cerebrale,
- 10) iperfosforilazione della proteina tau nel muscolo,
- 11) infiltrazione di cellule di tipo infiammatorio nel muscolo,
- 12) alterazioni dell'innervazione simpatica della milza e riduzione della vitalità degli splenociti.

Un aspetto della presente invenzione riguarda l'animale transgenico anti-NGF come modello di studio per le patologie indotte da depravazione di NGF. La depravazione di NGF a livello sistematico potrebbe avere diverse eziologie, anche di carattere autoimmune. A livello locale, una mancanza o limitata disponibilità di NGF da parte delle cellule bersaglio, può essere causata ad esempio da eventi traumatici (denervazione).

Sorprendentemente, molte delle caratteristiche del modello animale transgenico descritto nella presente invenzione, sono del tutto assimilabili a quelle presentate a livello macroscopico, istologico e molecolare dai malati di Alzheimer. La presente invenzione fornisce quindi un modello transgenico animale non umano per lo studio della malattia di Alzheimer. Le caratteristiche di questo modello sono riassunte in tabella 1, dove vengono riportate in confronto con quelle di altri modelli di animali transgenici proposti per questa malattia. Come appare dalla tabella 1 l'animale transgenico della presente invenzione presenta caratteristiche che, nel loro complesso, non sono mai state osservate nei modelli animali finora messi a punto (Hsiao et al, 1996 e WO 95/20666 e

1904PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

WO 97/48792; Citron et al, 1997; Borchelt et al, 1997; Holcomb et al, 1998; Wong et al, 1999; Gotz et al, 1995; Brion et al., 1999, Jin et al; 1998; Games et al, 1995; Irizzary et al, 1997).

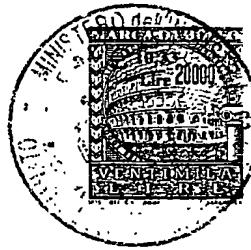


Tabella 1

|   | topo transgenico per APP <sup>5,9,10</sup> | topo transgenico o per PS-1 <sup>2</sup> | topo transgenico per APP e PS-1 <sup>3,4,5</sup> | topo transgenico per proteina tau umana mutata <sup>6</sup> | topo transgenico per proteina tau umana mutata <sup>7</sup> | topo transgenico per frammento C-99 di bPP <sup>8</sup> | topo transgenico per NGF (topo anti-NGF) |
|---|--|--|--|---|---|---|--|
| <b>DEFICIT</b>                                    |  |  |  |   |   |   |  |
| Dimensioni del cervello                           | -  | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Diminuzione di spessore della corteccia cerebrale | -  | -  | -  | -   | -   | -   | +++                                      |
| Atrofia del cervelletto                           | -  | -  | -  | -   | -   | -   | +++                                      |
| Dilatazione dei ventricoli cerebrali              | -  | -  | -  | -   | -   | -   | +++                                      |
| Deficit della memoria e dell'orientamento         | ++   | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Perdita neuronale                                 | -  | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Apoptosi  | -  | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Placche amiloidi                                  | ++   | ++                                       | +++  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Iperfosforilazione di tau                         | -  | -  | -  | ++  | +   | -   | ++                                       |
| Neurofibrillary tangles/ neuropil threads         | ++   | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Attivazione delle cellule della microglia         | -  | -  | -  | -   | +   | -   | ++                                       |
| Deficit colinergico                               | +  | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Atrofia dei scheletrici                           | muscoli                                    | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |
| Depositi amiloidi nei muscoli                     | nei scheletrici (colorazione Congo Red)    | -  | -  | -   | -   | -   | ++                                       |

|   | topo transgenico per APP <sup>5,9,10</sup> | topo transgenic o per PS-1 <sup>2</sup> | topo transgenic o per APP e PS-1 <sup>3,4,5</sup> | topo transgenico per proteina tau umana mutata <sup>6</sup> | topo transgenic o per proteina tau umana mutata <sup>7</sup> | topo transgenico per frammento C- 99 di $\beta$ PP <sup>8</sup> | topo transgenico per anticorpi anti- NGF (topo anti-NGF) |
|---|--|---|---|---|--|---|--|
| <b>DEFICIT</b>  |  |   |   |   |  |   |  |
| Depositi amiloidei nel muscolo scheletrico (anti-APP IH)      | -  | -                                       | -   | -   | -  | ++  | ++   |
| Tau iperfosforilata nel muscolo (IH)                          | -  | -                                       | -   | -   | -  | +   | +  |
| Infiltrazione di macrofagi                                    | -  | -                                       | -   | -   | +++  | +++   | +++  |
| Vacuolizzazione delle fibre muscolari                         | -  | -                                       | -   | -   | +++  | ++  | ++   |
| Aumento del numero di nuclei in posizione centrale (miofibra) | -  | -                                       | -   | -   | -  | ++  | ++   |

<sup>1</sup>Hsiao et al., 1996.<sup>2</sup>Citron et al., 1997.<sup>3</sup>Borchelt et al., 1997.<sup>4</sup>Holcomb et al., 1998.<sup>5</sup>Wong et al., 1999.<sup>6</sup>Gotz et al., 1995.<sup>7</sup>Brion et al., 1999.<sup>8</sup>Jin et al., 1998.<sup>9</sup>Games et al., 1995.<sup>10</sup>Irizzary et al., 1997.

Risulta quindi evidente che l'animale transgenico della presente invenzione costituisce un modello animale per la malattia di Alzheimer molto più completo di quelli finora proposti. I deficit riscontrati nel topo anti-NGF, dovuti all'espressione del transgene, sono infatti a livello del sistema nervoso centrale e periferico, a livello cognitivo, a livello muscolare ed inoltre a livello morfologico-funzionale nella milza dove possono essere riscontrate anomalie nel pattern di espressione delle immunoglobuline. Risultano a questo proposito particolarmente interessanti le crescenti evidenze sperimentali che indicano come centrale il ruolo del sistema immunitario nello sviluppo della malattia di Alzheimer (Kalaria, 1993).

La preparazione dell'animale transgenico è effettuata per incrocio di due ceppi di topi transgenici parentali (progenitori), di cui uno transgenico per la catena pesante di un anticorpo anti-NGF e l'altro per la catena leggera, ed è questo metodo di preparazione un ulteriore aspetto della presente invenzione. Le due linee di animali transgenici parentali vengono preparati mediante microiniezione del DNA plasmidico in cellule ES o nell'oocita fecondato secondo metodiche standard, conosciute al tecnico del ramo.

Generalmente i vettori plasmidici contenenti le unità trascrizionali per l'espressione del cDNA di una e dell'altra delle due catene immunoglobuliniche, vengono purificati, ad esempio mediante bandeggio in un gradiente continuo di CsCl, quindi diluiti in soluzioni fisiologiche. I vettori possono essere microiniettati tal quali nel pronucleo di oociti fecondati, possono essere linearizzati mediante restrizione enzimatica in

un sito unico, oppure le unità trascrizionali separate mediante restrizione enzimatica dal vettore, purificate ad esempio mediante gel elettroforesi o colonnine a scambio ionico, ed introdotte separatamente nei pronuclei.

Preferibilmente l'oocita è di topo, ancor più preferibilmente del ceppo B6SJL.

Le due catene immunoglobuliniche dell'anticorpo anti-NGF possono essere chimeriche, ottenute per assemblaggio delle regioni variabili murine di un anticorpo monoclonale anti-NGF, quale il Mab  $\alpha$ D11, con le regioni costanti delle catene leggere K e pesanti  $\gamma 1$  umane, come descritto nella presente invenzione, oppure derivate tal quali dal cDNA specifico dell'ibridoma secerente. L'espressione delle due catene anticorpali nel topo transgenico è controllata da un promotore forte o virale, quale il CMV IE (CytoMegalovirus Immediate Early), che viene espresso ubiquitariamente. Altri motori ubiquitari che possono essere utilizzati sono il promotore del LTR di RSV (Rouss Sarcoma Virus) o il promotore dei geni precoci di SV40 (SV40 IE). In una ulteriore realizzazione dell'invenzione, i due transgeni possono essere posti sotto il controllo di due motori differenti al fine di modulare l'espressione dell'anticorpo correttamente assemblato e funzionale solo in particolari distretti dell'organismo. Al fine di ottenere l'espressione dell'anticorpo funzionale localizzata solo in un particolare distretto o regolata nel tempo, possono tuttavia essere utilizzati motori tessuto specifici o inducibili che potranno anche essere diversi tra le due catene anticorpali. La preparazione dell'animale transgenico effettuata secondo il metodo dell'invenzione determina l'espressione dell'anticorpo funzionale



nell'animale transgenico adulto a livelli circa 2000 volte superiori che alla nascita e questo consente da un lato di aumentare l'efficienza di ottenimento di prole vitale transgenica per entrambe le catene dell'anticorpo, secondo il metodo dell'invenzione, fino all'80%, e dall'altro di mettere in evidenza il fenotipo dovuto all'azione dell'NGF solo nel periodo adulto, evitando la neutralizzazione dell'NGF durante il differenziamento neuronale.

I topi transgenici derivati secondo il metodo dell'invenzione esprimono, a vari livelli e comunque in quantità compresa tra 50 e 500 ng/ml di siero, l'anticorpo chimerico funzionale costituito da entrambe le catene correttamente assemblate e secrete e non sviluppano un fenotipo letale nelle prime fasi di vita postnatale, al contrario di quanto avviene per l'animale transgenico ottenuto per microiniezione dei plasmidi codificanti per entrambe le catene immunoglobuliniche nello stesso oocita.

E' stato inoltre osservato che il fenotipo a carico dell'apparato muscolare del topo anti-NGF può essere revertito mediante somministrazione locale di NGF. Secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione è quindi diretta all'uso di NGF per la preparazione di composizioni farmaceutiche di utilizzo nella terapia di patologie muscolari, quali le distrofie/atrofie muscolari. La somministrazione di questa neurotrofina può essere effettuata con diverse modalità tra cui: iniezione intramuscolare di NGF, ad esempio ricombinante, sciolto in opportune soluzioni fisiologiche, oppure per mezzo di iniezione diretta di vettori plasmidici o virali ricombinanti, ad esempio adenovirus, oppure mediante impianto nel muscolo di cellule geneticamente ingegnerizzate per la secrezione di NGF. Il dosaggio può

dipendere da diverse variabili quali l'attività specifica della proteina, la gravità della patologia da trattare, le condizioni generali di salute del paziente e potrà comunque essere compreso tra 2-100 µg /kg di peso corporeo.

#### Descrizione delle figure

Figura 1: Caratterizzazione molecolare dei topi transgenici progenitori

(A) Unità trascrizionali utilizzate per la produzione del topo transgenico: catena leggera (pannello superiore) e catena pesante (pannello inferiore). CK e CH1-CH3, regioni costanti umane delle catene leggere (K) e pesanti ( $\gamma$ 1); regioni variabili delle catene leggere (VL) e pesanti (VH) dell'anticorpo monoclonale  $\alpha$ D11; pCMV promotore di Cytomegalovirus.

(B) Schema dell'incrocio effettuato per la generazione del topo transgenico anti-NGF esprimente l'anticorpo anti-NGF funzionale. VK- $\alpha$ D11 X VH- $\alpha$ D11 (VK: linea progenitrice transgenica per la catena leggera dell'anticorpo  $\alpha$ D11; VH : linea progenitrice transgenica per la catena pesante dell'anticorpo  $\alpha$ D11

(C) Analisi mediante PCR dei transgeni VK (pannello superiore) e VH (pannello inferiore). Il gel mostra l'analisi effettuata su 12 topi orozigoti incrociati con topi non transgenici.

(D) Analisi mediante Dot blot di quattro linee di topi esprimenti la catena leggera o pesante dell'anticorpo  $\alpha$ D11 (VK- $\alpha$ D11 o VH- $\alpha$ D11).

(E) Livelli di VH- $\alpha$ D11 (sinistra) e VK- $\alpha$ D11 (destra) misurati nel cuore al tempo P1 giorno e P90 giorni mediante analisi di Phosphoimaging, normalizzati per l'mRNA di  $\beta$ -actina (media delle conte +/- SEM)

Figura 2: Espressione dell'anticorpo anti-NGF funzionale in cellule neuronali.

(A) Espressione della catena VH in cellule di Purkinje del cervelletto di topo progenitore transgenico per la catena pesante (linea C: controllo negativo). Valore della barra di scala=38  $\mu$ m.

(B) Espressione di VK (sinistra) e VH (centro) nei DRG (Dorsal Root Ganglia) di topi anti-NGF della famiglia 1 di topi (transgenici per entrambe le catene). La co-espressione di entrambe le catene nella stessa cellula è mostrata nel pannello di destra. Valore della barra di scala=75  $\mu$ m.

(C) Livelli di anticorpo ricombinante  $\alpha$ D11 di topi della famiglia 1 e 2 di topi anti-NGF al tempo 1 giorno e 90 giorni, misurati nel siero (sinistra) e nel cervello (destra). La linea punteggiata rappresenta il limite di detezione del saggio (0,1 ng/ml e 0,1 ng/mg, rispettivamente).

(D) Topo transgenico di controllo (transgenico solo per VH, sotto) e di un topo anti-NGF della famiglia 3 (sopra), al 17° giorno. Il topo anti-NGF è più piccolo del controllo.

(E) Peso corporeo del topo anti-NGF (famiglia 1 e famiglia 2) (sinistra) e di quello di controllo (destra).

Figura 3. Marker istologici e molecolari del topo anti-NGF.

A-H: sezioni del telencefalo basale; I-L: sezioni di ippocampo.

A-B: colorazione per ChAT. A: topi di controllo; B: topi anti-NGF.

C-D: innervazione colinergica verso la corteccia frontale: CP: caudato/putamen; FC: corteccia frontale; GCC: genus del corpo calloso.

C: topo di controllo; D: topo anti-NGF.

E-F: colorazione per TrkA. E: topo di controllo; F: topo anti-NGF.

G-H: colorazione per p75. G: topo di controllo; H: topo anti-NGF

I-L: colorazione per ChAT. I: topo di controllo; H: topo anti-NGF

Sezioni M ed N: colorazione di Timm per le "mossy fibers" dell'ippocampo. M: topo di controllo; N: topo anti-NGF.

Figura 4: Dilatazione dei ventricoli cerebrali.

Sezioni coronali di encefalo di topi colorate con il metodo di Nissl. I topi anti-NGF "anziani" (15-18 mesi) hanno i ventricoli laterali (VL) dilatati (B) rispetto ai topi di controllo (A). Si osserva atrofia dei nuclei settoippocampali (SHI) e dei nuclei laterali del setto (LS).

Figura 5. Atrofia della corteccia cerebrale.

Sezioni coronali di encefalo di topi ottenute all'altezza del telencefalo basale. La corteccia frontale è atrofica nei topi transgenici (B) rispetto a quella dei topi di controllo (A).

La barra bianca indica lo spessore della corteccia misurata in uno stesso punto anatomico.

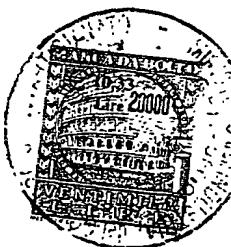


Figura 6. Atrofia dell'ippocampo.

Gli ippocampi (Hp) dei topi di controllo sono perfettamente formati (A) rispetto ai topi transgenici (B).

Figura 7. Apoptosi neuronale.

Marcatura di neuroni corticali apoptotici ottenuta con il metodo TUNEL.

Nei topi di controllo (A) non si osservano cellule positive, mentre nei topi anti-NGF (B) si osservano numerosi nuclei con frammentazione del DNA

Figura 8. Fosforilazione della proteina tau

I topi transgenici presentano una marcata positività il segmento N-

terminale della proteina tau (B), tau non fosforilata (D) e ma soprattutto per tau fosforilata (F). Nei topi di controllo non c'è marcatura (A, C, E). La marcatura è soprattutto localizzata a livello della corteccia cerebrale (per esempio in E). La marcatura per il segmento N- terminale della proteina tau (B) è presente in alcune cellule dell'ippocampo (frecce).

Figura 9. Deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel cervello.

Sia l'anticorpo MN10 (anti-APP) che l'anticorpo contro la proteina precursore della  $\beta$ -amiloide evidenziano la presenza di "placche" nella corteccia paracingolare e nel neo-striato in topi di controllo (A) e in maggior numero e di maggiori dimensioni nei topi transgenici anti-NGF (B). In entrambe le figure le frecce puntano alle placche di beta amiloide.

Figura 10: Atrofia muscolare.

Sezioni trasversali dei muscoli prelevati da topi di controllo e topi anti-NGF. Colorazione : ematossilina eosina. M. retto mediale della coscia di un topo di controllo (A) e di un topo transgenico (B). M. gastrocnemio di un topo di controllo (C) e di un topo transgenico (D). M. tibiale anteriore di un topo di controllo (E) e di un topo transgenico (F).

Figura 11. Deposizione di amiloide nel muscolo.

La colorazione con Congo Red evidenzia la presenza di depositi di amiloide nei muscoli di topi transgenici (B) rispetto a quelli di controllo (A).

Figura 12. Deposizione di amiloide nel muscolo.

L' immunoreattività contro la proteina  $\beta$ -amiloide nei muscoli di topi di controllo "anziani" (A) è completamente assente. Nei topi anti-NGF (B) si assiste ad un aumento della marcatura, evidenziata dal precipitato

marrone, a livello del sarcolemma e del citoplasma delle miofibre.

Figura 13. Fosforilazione della proteina tau nel muscolo.

L'immunoreattività contro la proteina tau fosforilata nei muscoli di topi di controllo "anziani" (A) è completamente assente. Nei topi anti-NGF si assiste ad un aumento della marcatura, evidenziata dal precipitato marrone, a livello del sarcolemma e del citoplasma delle miofibre (B)

Figura 14. Infiltrazione di macrofagi nel muscolo.

Sezioni longitudinali (A) e trasversali (B) di muscoli di topi transgenici anti-NGF "anziani". Fra le miofibre si osserva la presenza di cellule di tipo immunitario, quali i macrofagi (frecce).

Figura 15. Posizione dei nuclei nelle miofibre di topi anti-NGF.

In alcune miofibre dei topi "anziani" si osserva la presenza di nuclei posti al centro della cellula (frecce), anziche' alla periferia (asterischi).

Figura 16. Test di comportamento di topi anti-NGF.

A) Test nocicettivo di topi transgenici anti-NGF e di topi di controllo.

B) Test "Open field"

C) Test "Rotarod"

D) Curve di "orientamento spaziale" per topi anti-NGF (n=10, cerchi pieni) e topi di controllo (n=10, cerchi vuoti) nel test del labirinto radiale.

Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Il numero di entrate necessarie per trovare tutti e quattro i pasti è riportata in funzione del tempo.

E) Test di mantenimento delle funzioni acquisite. Effettuato a 31 giorni dalla fase di apprendimento.

F) Test di trasferimento delle nozioni acquisite, effettuato il giorno dopo il

test di mantenimento.

**Esempio 1. Produzione dei topi transgenici anti-NGF e loro caratterizzazione molecolare.**

Preparazione del transgene. L'anticorpo chimerico ricombinante è stato ottenuto per assemblaggio delle sequenze di DNA corrispondente alle regioni variabili murine dell'anticorpo monoclonale anti-NGF Mab  $\alpha$ D11 (Ruberti et al. et al., 1993) (Genbank, n° di accesso: L17077/NID g310168, catena pesante e L17078/g310169, catena leggera) con il DNA corrispondente alle regioni costanti delle catene leggere K e pesanti  $\gamma$ 1 umane. Le unità trascrizionali corrispondenti alla catena chimerica leggera e a quella pesante (figura 1A), contenenti in 5' il promotore di Cytomegalovirus ed in 3' il sito di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino (bGH), clonate rispettivamente nei vettori di espressione pcDNA1-NeoVK $\alpha$ D11HuCK e pcDNA1-NeoVH $\alpha$ D11HuC $\gamma$  sono state estratte mediante restrizione enzimatica con gli enzimi KpnI-ApaI e KpnI-XbaI rispettivamente, purificate e microiniettate separatamente o in combinazione nel pronucleo di cellule uovo di topo del ceppo B6SJL fecondate, secondo metodiche standard descritte ad esempio in Allen et al., 1987. Sono stati ottenuti due progenitori transgenici per la catena leggera (famiglia A, basso produttore e B, alto produttore), due per quella pesante dell'anticorpo (famiglia C, alto produttore e D, basso produttore) e tre per entrambe (doppio transgenico). Questi ultimi progenitori, che esprimono l'anticorpo ad un livello di circa 50 ng/ml, non sono in grado di riprodursi e sono quindi inutilizzabili per il proseguimento delle ricerche.

L'analisi molecolare dei topi transgenici progenitori (famiglie A, B, C, D) è stata effettuata mediante PCR (Figura 1C) o Dot Blot (Figura 1 D), su DNA genomico estratto da biopsie ottenute dalla coda, come descritto in Piccioli et al., 1995. L'RNA messaggero è stato estratto secondo il metodo di Chomcynski and Sacchi, 1987 a tempi diversi dalla nascita ed è stato analizzato mediante RNase-protection.

Preparazione del topo anti-NGF. Al fine di generare animali transgenici per l'anticorpo funzionale, composto da entrambe le catene, i due progenitori transgenici solo per la catena leggera (progenitori A e B) o solo per quella pesante (progenitori C e D) sono stati incrociati in diverse combinazioni (Figura 1B). Solo gli incroci dei progenitori A con D e dei progenitori B con C, che danno rispettivamente famiglia 1 e famiglia 2 di topi eterozigoti doppi transgenici, risultano fecondi e generano animali vitali con una efficienza superiore all'80%.

Caratterizzazione del topo anti-NGF.

I livelli di anticorpo funzionale o delle catene leggera o pesante degli animali transgenici sono stati misurati mediante saggio ELISA (descritto in Molnar et al., 1998), utilizzando un anticorpo secondario anti-IgG umane marcato con biotina, dopo diluizione del siero o degli omogenati di cervello (preparati come descritto in Piccioli et al., 1995) 1:10 in PBS-2% latte in polvere.

I livelli di anticorpo chimerico anti-NGF della famiglia 1 e 2, misurati nel siero e nel tessuto cerebrale di animali adulti (90 giorni), superano i 100 ng/ml ed i 100 ng/mg, rispettivamente. Nella famiglia 2 i livelli risultano essere circa doppi che nella famiglia 1. Nell'animale appena nato (1



giorno) i livelli di anticorpo sono invece inferiori al limite di detectabilità del saggio (0,1 ng/ml nel siero e 0,1 ng/mg nei tessuti) (Figura 2C).

Gli mRNA specifici per le catene VH e VK chimeriche vengono espressi in diversi tessuti tra cui il cervello, il rene, il cuore, il muscolo, il fegato ed i testicoli. I livelli di mRNA di entrambe le catene sono circa sei volte superiori nell'animale adulto (90 giorni) rispetto al neonato (1 giorno) (Figura 1 E).

Risulta quindi che l'aumento di espressione (1-2000X) dell'anticorpo funzionale anti-NGF osservato nell'animale eterozigote anti-NGF (doppio transgenico), è solo in parte dovuto all'aumento dei livelli di espressione di mRNA.

Sezioni di organo di topi anti-NGF sono quindi state fissate mediante perfusione intracardiaciaca di paraformaldeide 4% in PBS, raccolte su vetrino, preincubate in siero fetale 10% e BSA 5%, quindi utilizzate per evidenziare mediante immuno-istochimica l'espressione di diversi antigeni: in particolare la co-espressione della catena leggera e di quella pesante dell'anticorpo anti-NGF sono state evidenziate mediante anti-human light o heavy chain biotinilate (Amersham), rivelate da avidina-biotina coniugata con HRP o AP (Elite Standard kits, Vector). La localizzazione a livello cerebrale è mostrata in figura 2A, in figura 2B è evidenziato, mediante immuno-istochimica, che le due catene dell'anticorpo chimerico sono frequentemente co-espresso.

**Esempio 2. Knockout fenotipico dell'NGF nel topo transgenico anti-NGF.**

La caratterizzazione del fenotipo del topo anti-NGF è stata effettuata a

vari livelli: macroscopico, istologico e molecolare.

A livello macroscopico, nelle prime tre-quattro settimane di vita i topi transgenici anti-NGF non mostrano anomalie di rilievo, ad esclusione di una diminuzione del peso corporeo di circa il 25% rispetto a corrispondenti topi di controllo (Figura 2 D ed E).

In genere, gli esperimenti sono stati effettuati con gruppi di numerosità n=6 animali transgenici anti-NGF con livelli anticorpo anti-NGF compresi tra 50 e 300 ng/ml; come controlli sono stati utilizzati topi transgenici solo per la catena pesante (VH) dell'anticorpo (progenitori C o D), quindi non esprimenti l'anticorpo funzionale.

A livello istologico e molecolare vengono osservate le seguenti differenze rispetto ai topi normali, suddivise per distretto: 1) sistema nervoso centrale e periferico, 2) apparato muscolare e 3) milza.

#### 1) Sistema nervoso centrale e periferico.

Nel telencefalo basale si osserva una riduzione fino al 57% del numero di neuroni positivi per l'acetil-trasferasi ed una riduzione del livello di espressione, mentre fino al 70% in meno dei neuroni è osservabile nell'ippocampo. Inoltre le cellule appaiono morfologicamente più piccole. Per quanto riguarda il sistema nervoso periferico, i gangli cervicali superiori risultano fino al 45% più piccoli del controllo; anche in questo caso le cellule costituenti appaiono morfologicamente più piccole (Figura 3 A-B).

L'aspetto morfologico ed istologico degli encefali di topi che esprimono l'anticorpo ricombinante anti-NGF è stato analizzato in topi transgenici con un'età compresa tra 15 e 18 mesi (animali "anziani") in

combinazione con la presenza di marcatori fenotipici di malattie neurodegenerative, quali: "neuronal loss" e apoptosis, sintesi di colin-acetiltransferasi (ChAT) (Figura 3 A,B), misurata mediante immuno-istochimica con antisiero anti-ChAT (Chemicon), rapporto proteina tau fosforilata e non fosforilata (misurate mediante immuno-istochimica con antisieri specifici), presenza di proteina  $\beta$ -amiloide e del precursore della proteina amiloide APP (Amyloid Precursor Protein) fosforilata (misurati mediante immuno-istochimica con antisieri specifici). La numerosità dei gruppi utilizzati per gli esperimenti, dove non altrimenti indicata, è stata pari a n=6 transgenici anti-NGF con livelli anticorpo anti-NGF transgenico compresi tra 50 e 300 ng/ml; come controlli sono stati utilizzati topi transgenici solo per la catena pesante (VH) dell'anticorpo (progenitori C o D), quindi non esprimenti l'anticorpo funzionale

I risultati ottenuti possono essere riassunti nei seguenti punti:

- (a) dilatazione dei ventricoli cerebrali (Figura 4). La gravità della dilatazione ventricolare si accompagna ad una marcata atrofia della corteccia cerebrale (Figura 5) e dell'ippocampo (Figura 6).
- (b) neurodegenerazione e perdita neuronale. È possibile visualizzare cellule apoptotiche nei topi con più gravi danni a livello cerebrale, come evidenziato dalla metodica TUNEL (Figura 7). Fenomeni apoptotici sono indice di una progressiva morte cellulare.
- (c) diminuzione della sintesi di colin-acetiltransferasi (ChAT), (Figura 3 A-B e I-L) specialmente nel telencefalo basale. In particolare non si osservano neuroni positivi per questo marcitore nel nucleo del setto mediale in nessuno degli animali analizzati. L'espressione, in rapporto a

quella osservata in topi transgenici più giovani (2-3 mesi di età), è diminuita. Una inferiore espressione si osserva anche a carico dei due recettori dell'NGF TrKA (Figura 3 E-F) e p75 nel telencefalo basale (Figura 3 G-H). In particolare, la diminuzione delle cellule positive per TrkA è più consistente rispetto a quella per p75.

(d) Aumento della fosforilazione di proteina tau (Figura 8). Utilizzando anticorpi specifici contro il segmento N-terminale della proteina tau [Alz-50 (Wolozin et al., 1986)] (Figura 8A e 8B), contro la proteina tau non fosforilata [anti-Tau 1(Grundke-Iqbali et al., 1986)] (Figura 8C e 8D) e contro lo stesso epitopo della proteina tau fosforilata [mAb AT-8 (Greenberg e Davies, 1990)] (Figura 8E e 8F), è stato evidenziato mediante immuno-istochimica, un consistente aumento generalizzato della sintesi di tau ma, soprattutto della sua componente fosforilata. Gli anticorpi utilizzati marcano neuroni corticali che presentano una morfologia alterata, rivelando la presenza di "neuropil threads", "ghosts" e "tangles". La marcatura contro la forma fosforilata di tau ha evidenziato un consistente aumento di questa proteina anche nelle cellule della microglia che vengono attivate in processi neurodegenerativi. Anticorpi contro la proteina  $\beta$ -amiloide e contro la proteina precursore dell'amiloide [APP (Glenner e Wong, 1984)] evidenziano la presenza di numerose placche sia nella corteccia paracingolare che nel neostriato (Figura 9A e 9B).

In conclusione, i topi transgenici che esprimono l'anticorpo anti-NGF ricapitolano a livello del Sistema Nervoso Centrale e Periferico molte delle alterazioni patologiche tipiche di malattie neurodegenerative, in



particolare della malattia di Alzheimer.

## 2) Apparato muscolare.

I topi analizzati (n=15) di età compresa tra i 45 e 60 giorni, mostrano a livello macroscopico un'andatura ondeggiante, dovuta ad una anormale posizione delle zampe posteriori e all'appoggio sulla punta delle dita, e sviluppano spesso scoliosi della colonna vertebrale.

L'analisi anatomica mostra una riduzione dei muscoli scheletrici longitudinali della schiena, dei flessori e degli adduttori delle zampe posteriori, caratteristica non osservabile in altri muscoli, per esempio dei corrispondenti muscoli delle zampe anteriori.

Alcuni deficit sono stati meglio caratterizzati e sono descritti nei seguenti punti in dettaglio:

a) distrofia muscolare, caratterizzata dal punto di vista morfologico ed istologico. L'atrofia delle fibre muscolari è presente, in tutti gli animali analizzati (n= 15), a livello dei muscoli che consentono i movimenti della colonna vertebrale e coadiuvano la stabilità delle connessioni fra vertebra e vertebra (m. lunghissimo del dorso e mm. intervertebrali, rispettivamente). Inoltre, in tutti gli animali, la riduzione del diametro delle fibre muscolari (fino al 50%) è osservabile nel 70% delle fibre: nei muscoli adduttori (m. retto mediale della coscia, mm. grande e piccolo adduttore), nei muscoli flessori della coscia (mm. ischiotibiali esterno, medio e interno) ed estensori del metatarso (m. gastrocnemio e m. soleo). L'atrofia non è invece presente a livello dei muscoli flessori del metatarso (m. tibiale anteriore e mm. estensori delle falangi) ed è molto meno evidente nei muscoli estensori degli arti anteriori (m. tricipite

brachiale). Tutte queste differenze vengono mostrate nella Figura 10. Inoltre tutte le fibre muscolari colpite da atrofia presentano anche una marcata vacuolizzazione (Figura 10 B-E) e una più intensa colorazione per l'ematossilina/eosina.

b) scoliosi, presente in alcuni animali (n<6), associata in alcuni casi con uno sviluppo incompleto dei corpi vertebrali.

c) atrofia muscolare, tipizzata a livello molecolare come segue:

c.1) riespressione del recettore per l'NGF a bassa affinità (p75). E' particolarmente evidente in alcune cellule muscolari che presentano alterazioni nella distribuzione dei recettori nicotinici a livello delle giunzioni neuromuscolari.

c.2) diminuzione del numero delle terminazioni nervose peptidergiche a livello di giunzioni neuromuscolari. Questa diminuzione è stata evidenziata con anticorpi contro il peptide "calcitonin gene-related peptide" [CGRP (Gibson et al., 1984)].

c.3) assenza dell'aggregazione dei recettori per l'acetilcolina presenti nella membrana plasmatica delle cellule muscolari ed evidenziati dal legame irreversibile della alfa-bungarotossina (Changeux, 1991), dovuta ad una mancata innervazione della fibra muscolare. La distribuzione delle cellule muscolari che presentano questa alterazione conferisce ai muscoli dei topi transgenici un caratteristico "pattern" a mosaico.

c.4) aumento dell'immunoreattività per la distrofina, evidenziabile nelle stesse cellule che presentano le alterazioni molecolari sopra descritte, mediante immuno-istochimica con l'anticorpo D-8043 (Sigma). La distrofina è una proteina del citoscheletro della cellula muscolare

coinvolta nella contrazione e nell'aggregazione dei recettori colinergici.

E' noto che un aumento della sintesi di distrofina avviene in coincidenza con la denervazione del muscolo.

c.5) alterato metabolismo dell'ATPasi dovuto al mancato effetto trofico da parte del nervo.

c.6) marcata deposizione di sostanza amiloide, evidenziata da una caratteristica marcatura citoplasmatica ad anello con Congo Red (Figura 11 A-B). La presenza di amiloide, ed in particolare di  $\beta$ -amiloide, è stata evidenziata anche tramite immuno-istochimica contro la proteina precursore della  $\beta$ -amiloide (Figura 12 A-B) in topi anziani.

c.7) proteina tau fosforilata nei muscoli dei topi anziani (di età compresa tra 15 e 18 mesi) Figura 13A-B.

c.8) presenza di numerose fibre muscolari con nuclei localizzati in posizione centrale anziché al di sotto del sarcolemma in topi anti-NGF "anziani" (Figura 15). L'istologia mette in evidenza una infiltrazione di cellule di origine immunitaria, probabilmente macrofagi, fra le fibre muscolari (Figura 14 A-B).

La presenza di depositi di  $\beta$ -amiloide e di proteina tau iperfosforilata ed inoltre dei nuclei posti in posizione centrale e della infiltrazione macrofagica, correla con quanto osservato nella miosite a corpi inclusi (inclusion body myositis, IBM), patologia strettamente in relazione con la malattia di Alzheimer.

### 3) Milza.

A livello anatomico la localizzazione dell'innervazione simpatica è sparsa nel centro germinale e nella zona marginale, anziché nelle vicinanze

dell'arteria centrale, come nei topi di controllo. Il recupero degli splenociti vitali è ridotto di circa un ordine di grandezza ( $2-3 \times 10^6$  vs.  $2-3 \times 10^7$  dei controlli) nei topi transgenici anti-NGF, come osservato mediante citometria a flusso. Funzionalmente si può osservare una riduzione del numero di linfociti IgG positivi ed un discreto aumento di linfociti IgD positivi, come misurato dopo incubazione (30', 4°C) degli splenociti con anticorpi primari marcati con FITC anti-IgG (Sigma), IgM, IgA, IgD di topo (Pharmingen) - ed analisi con Coulter Epics - Elite Esp Flow Cytometer a 488 nm.

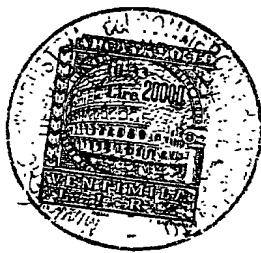
Inoltre, nella polpa rossa può essere evidenziata frammentazione del DNA, che indica apoptosi in accordo con il ridotto recupero di splenociti vitali.

#### **Esempio 3. Analisi del comportamento di topi transgenici anti-NGF.**

E' stata effettuata su animali (n=6) di età compresa tra 12 e 18 mesi, selezionando animali senza evidenti anomalie di andatura.

Sono state riscontrate le seguenti anomalie rispetto agli animali di controllo riassunte in Figura 16:

- aumento del tempo di latenza per la sensibilità al calore, che passa da 3" nei topi di controllo a 16" nei topi anti-NGF, misurato secondo il saggio nocicettivo della "piastra calda", come descritto in Eddy et al., 1953;
- orientamento spaziale: i topi anti-NGF compiono un numero più alto di errori durante la fase di apprendimento nei primi tre giorni (working memory learning), le due curve di apprendimento differiscono infatti in modo significativo (test di RMANOVA a due vie,  $p<0,05$ ) tuttavia il livello



finale di apprendimento non differisce da quello dei topi di controllo, come misurato nel test del "labirinto radiale", effettuato come segue: gli animali furono posti in labirinto radiale ad 8 braccia e lasciati liberi di nutrirsi per 5' e di familiarizzare con il labirinto per due giorni (pre-training). Per la prova, le stesse quattro braccia furono riempite di cibo ogni giorno: all'inizio di ogni prova, i topi furono lasciati al centro del labirinto, liberi di esplorarlo: il test fu fatto terminare a cibo terminato, o quando furono rilevate 25 entrate nelle braccia del labirinto: le prove furono ripetute due volte al giorno per 14 giorni, misurando gli errori commessi (errori di memoria a breve e lungo termine) ed il tempo utilizzato. Il livello iniziale e finale di apprendimento fu misurato dal numero medio di errori commessi nei primi tre giorni e negli ultimi tre.

- capacità di mantenimento delle nozioni acquisite. I topi anti-NGF non mantengono le nozioni acquisite a 31 giorni dalla fase di apprendimento, come misurato nello stesso test del "labirinto radiale". Le curve di apprendimento furono comparate con il test di ANOVA a due vie (trattamento x tempo), e la significatività delle differenze verificata mediante T-test.

- deficit della capacità di trasferimento dell'insegnamento ad un'altra situazione, come misurato mediante test del "labirinto radiale", utilizzando uscite riempite di cibo diverse da quelle utilizzate durante la fase di apprendimento: I topi anti-NGF mostrano un chiaro deficit di apprendimento ( $p < 0,01$  in test di RMANOVA a due vie) rispetto ai controlli, anche dopo 5 giorni di apprendimento. Le differenze sono

dovute principalmente ad un numero più alto di errori di memoria a breve termine (T-test,  $p<0,006$ ).

**Esempio 4. Reversibilità della distrofia muscolare in topi anti-NGF mediante somministrazione locale di NGF.**

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in topi a partire dal 45 giorno di età, quando il tasso dell'anticorpo anti-NGF nel siero sta per raggiungere il livello massimo (osservato a 60 giorni).

L'NGF è stato somministrato localmente con metodi diversi: (a) per iniezione intramuscolare di NGF, (b) per mezzo di un vettore virale ricombinante (adenovirus) codificante per il cDNA dell'NGF o (c) l'impianto di fibroblasti che secernono NGF. Tutte le vie di somministrazione hanno previsto l'iniezione o l'impianto nel muscolo gastrocnemio, uno dei muscoli scheletrici colpiti da distrofia muscolare. Le iniezioni e gli impianti sono stati effettuati nella zampa destra, mentre il muscolo gastrocnemio della zampa sinistra è stato utilizzato come controllo. a) L'NGF è stato iniettato sotto forma di pellet, costituito da NGF miscelato a diazocellulosa in tampone borato a pH 8.0 per 72 ore e da una successiva neutralizzazione con glicina ad una concentrazione saturante (Hendry, 1982). Questo metodo consente la precisa localizzazione ed il rilascio lento di questa neurotrofina. Sono state utilizzate diverse concentrazioni di NGF comprese in un range fra i 100  $\mu$ g e 2 mg per animale. Per la somministrazione di cDNA secondo il metodo b), 10  $\mu$ l di una soluzione del vettore adenovirale pari a  $10^7$  pfu/ml sono stati iniettati nel muscolo gastrocnemio. Negli animali di controllo è stato iniettato un adenovirus ricombinante contenente il gene

reporter Lac Z di Escherichia coli. Sia in questo caso che in quello dell'impianto di fibroblasti (vedi dopo), la produzione di NGF è stata costante per almeno 1 mese, consentendo l'osservazione di una reversibilità del fenotipo.

Secondo il metodo c) sono stati impiantati nel muscolo, fibroblasti modificati geneticamente per secernere NGF tramite l'infezione con un vettore retrovirale codificante per il cDNA di questa neurotrofina, secondo il metodo descritto da Gage et al. (1990). Questo ha consentito di raggiungere una produzione in situ di NGF pari a 100 ng/10<sup>6</sup> cellule/giorno. I fibroblasti sono stati iniettati dopo risospensione in soluzione fisiologica sterile alla concentrazione pari a 2 x 10<sup>5</sup> cellule/μl. Il volume di iniezione è stato pari a 10 μl/animale.

Per verificare l'effetto della somministrazione di NGF, gli animali sono stati sacrificati dopo 7, 15 e 30 giorni dal momento dell'iniezione. Il muscolo iniettato e quello controlaterale sono stati prelevati e analizzati con tecniche istologiche ed immunoistochimiche per verificare l'attenuazione della distrofia e il ristabilirsi della normale innervazione. Si è potuto constatare che, in tutti gli animali iniettati, il diametro delle fibre muscolari è ritornato a valori simili a quelli degli animali di controllo. Inoltre, la loro morfologia e l'innervazione colinergica e peptidergica ha assunto un aspetto normale.

Per quanto riguarda il ristabilirsi del fenotipo colinergico nel telencefalo basale, sono stati utilizzati due differenti approcci. In una prima serie di esperimenti, è stato utilizzato, dopo anestesia, l'impianto di minipompe che rilasciano NGF. Un capillare in gomma è stato inserito nel ventricolo

laterale e quindi collegato con una minipompa osmotica collocata in una "tasca" dello strato sottocutaneo. Questa pompa è stata riempita con NGF (30 - 100 µg) diluito nella soluzione fisiologica di Ringer-Locke. Un altro gruppo di animali è stato trattato con un impianto di fibroblasti modificati geneticamente per la secrezione di NGF. I fibroblasti sono stati iniettati nel ventricolo laterale alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/µl. Il volume di iniezione è stato pari a 1.5 µl/animale. Questo secondo metodo ha consentito di verificare, tramite E.L.I.S.A., una produzione di NGF costante per 4 settimane dopo l'impianto. L'analisi della espressione di colinacetiltransferasi (ChAT) nei nuclei del telencefalo basale e l'analisi del comportamento di questi topi ha permesso di osservare la reversibilità del fenotipo osservato nei topi anti-NGF a livello del sistema colinergico.

Nell'insieme questi risultati confermano che la somministrazione di NGF è in grado di correggere il deficit muscolare e colinergico osservati nei topi anti-NGF.



**REFERENZE**

Allen, N.D., Barton, S.C., Surani M.A. and Reik W. (1987) production of transgenic mice. In *Mammalian development: A practical approach*, M. Monk, ed . (Washington DC: IRL Press) pp 217-234.

Baron P, Scarpini E, Meola G, Santilli I, Conti G, Pleasure D, Scarlato G (1994). Expression of the low-affinity NGF receptor during human muscle development, regeneration, and in tissue culture. *Muscle and Nerve* 17: 276-284.

Boissiere F, Faucheu B, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC (1997) Decreased TrkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 145: 245-252.

Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19:939-945.

Brion JP, Tremp G, Octave JN (1999) Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 154:255-270.

Changeux JP, Ducrét A, Sekine S (1992) Calcitonin gene-related peptides and neuromuscular interactions. *NY Acad Sci* 657:361-378.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3: 67-72.

Connor B, Dragunow M (1998) The role of neuronal growth factor in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 27: 1-39.

Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanini, M.P., Lanway, H.L., McMahon, Shelton, D.L., Levinson, A.D., S.B., and Phillips, H.S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop BF cholinergic neurons. *Cell* 76:1001-1011

Davies A M (1992) Cell death and the trophic requirements of developing sensory neurons. In *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*, S. Scott, ed. (Oxford: Oxford University Press), pp 194-214.

Eddy, N.B., and Leimbach, D. (1953) Synthetic analgesic (II): dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107: 385-396.

Eide F, Lowenstein DH and Reichardt LF (1993) Neurotrophins and their receptor- current concepts and implications for neurologic disease. *Exp. Neurol.* 121: 200-214.

Fukuchi K, Pham D, Hart M, Li L, Lindsey JR (1998) Amyloid-beta deposition in skeletal muscle of transgenic mice: possible model of inclusion body myopathy. *Am J Pathol* 153: 1687-1693

Gage, FH, Rosenberg, MB, Tuszyński, MH, Yoshioka, K, Armstrong, DM, Hayes, RC, and Friedmann, T (1990) gene therapy in the CNS: intracerebral grafting of genetically modified cells. *Prog Brain Res* 86: 205-217

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527.

Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor GP, Morrison, JFB, Kelly JS, Evans RM, Rosenfeld MG (1984) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight species. *J Neurosci* 4: 3101-3111.

Glenner GC, Wong CW (1984) Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biophys Biochem Res Commun* 120: 885-890.

Goedert M (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16: 460-465.

Gotz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, Burki K, Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 14: 1304-1313.

Greenberg SG, Davies P (1990) A preparation of Alzheimer paired

helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA 87: 5827-5831.

Grundke-Iqbali I, Iqbali K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4913-4917.

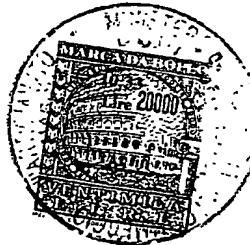
Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. Nat Med 4:97-100.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 274: 99-102.

Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT (1997b) A beta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. J Neurosci 17: 7053-7059.

Jin LW, Hearn MG, Ogburn CE, Dang N, Nochlin D, Ladiges WC, Martin GM (1998) Transgenic mice over-expressing the C-99 fragment of betaPP with an alpha-secretase site mutation develop a myopathy similar to human inclusion body myositis. Am J Pathol 153: 1679-1686

Kalaria RN (1993) The immunopathology of Alzheimer's disease and



some related disorders. *Brain Pathol* 3: 333-347.

Levi-Montalcini R and Booker B (1960) Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a Nerve Growth Factor Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:384-391.

Luxenberg JS, Haxby JV, Creasey H, Sundaram M, Rapoport SI (1987)

Rate of ventricular enlargement in dementia of the Alzheimer type correlates with rate of neuropsychological deterioration. *Neurology* 37: 1135-1140.

Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci* 18: 480-483.

Mizutani T, Amano N, Sasaki H, Morimatsu Y, Mori H, Yoshimura M, Yamanouchi H, Hayakawa K, Shimada H (1990) Senile dementia of Alzheimer type characterized by laminar neuronal loss exclusively in the hippocampus, parahippocampus and medial occipitotemporal cortex. *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 575-580.

Molnar, M., Tongiorgi, E., Avignone, E., Gonflori, S., Ruberti, F., Domenici, L., and Cattaneo, A. (1998). The effects of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies on developing BF neurons are transient and reversible. *Eur. J. Neurosci.* 10: 3127-3140.

Piccioli, P., Di Luzio, A., Amann, R., Schuligoj, R., Azim Surani, M., Donnerer, J., and Cattaneo, A. (1995). Neuroantibodies: ectopic expression of a recombinant anti-substance P antibody in the central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 15:373-384.

Ruberti, F., Bradbury, A., and Cattaneo, A. (1993). Cloning and expression of an anti-nerve growth factor (NGF) antibody for studies

using the neuroantibody approach. *Cell. Mol. Neurobiol.* 13:559-568.

Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. (1994) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during the development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367: 170-173

Selkoe DJ (1994) Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 4: 708-716.

Snider WD and Johnson EM Jr (1989) Neurotrophic molecules. *Ann. Neurol.* 26: 489-506.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13287-13292.

Wolozin BL, Pruchnicki A, Dickson DW, Davies P (1986) A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science* 232: 648-650.

Wong TP, Debeir T, Duff K, Cuello AC (1999) Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J Neurosci* 19:2706-2716.

**RIVENDICAZIONI**

1. Animale mammifero non umano transgenico per un anticorpo anti-NGF (NGF: Nerve Growth Factor).
2. Animale secondo la rivendicazione 1 in cui l'anticorpo anti-NGF blocca il legame dell'NGF ai suoi recettori.
3. Animale secondo la rivendicazione 1 che esprime l'anticorpo anti-NGF solo nell'eta' adulta.
4. Animale transgenico secondo la rivendicazione 3 che esprime l'anticorpo anti-NGF a livelli misurabili nel siero compresi tra 50 e 500 ng/ml.
5. Animale secondo la rivendicazione 1 dove l'anticorpo anti-NGF e' il monoclonale  $\alpha$ D11.
6. Animale secondo la rivendicazione 5 dove l'anticorpo  $\alpha$ D11 e' chimerico.
7. Animale secondo la rivendicazione 6 dove l'anticorpo chimerico e' umanizzato.
8. Animale secondo la rivendicazione 1 appartenente al genere murino.
9. Animale secondo la rivendicazione 8 appartenente alla razza BS6JL.
10. Animale transgenico secondo la rivendicazione 1 che esprime almeno una delle patologie comprese nel seguente gruppo:
  - sindromi neuro-degenerative
  - atrofia/distrofia muscolare
  - alterazione delle sottopolazioni linfocitarie e morte cellulare nella milza
11. Animale transgenico secondo la rivendicazione 10 in cui la sindrome

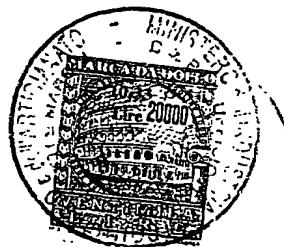
neurodegenerativa presenta almeno uno dei marcatori anatomici, o istologici, o molecolari, o fenotipici compresi nel seguente gruppo:

- dilatazione dei ventricoli cerebrali
- atrofia della corteccia cerebrale e/o totale scomparsa dell'ippocampo,
- perdita e/o apoptosi neuronale,
- deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide nel SNC,
- deficit cognitivi caratterizzati da perdita della memoria a lungo/breve termine,
- iperfosforilazione della proteina tau,
- patologia neurofibrillare.

12. Animale secondo la rivendicazione 11 dove almeno uno dei marcatori anatomici o istologici compresi nel seguente gruppo:

- dilatazione dei ventricoli cerebrali
- atrofia della corteccia cerebrale
- perdita neuronale

sono presenti ad un livello superiore a quello degli animali utilizzati come controllo.



13. Animale transgenico secondo la rivendicazione 10 in cui l'atrofia/distrofia muscolare e' accompagnata a livello muscolare, da almeno uno dei marcatori anatomico o istologico o molecolari o fenotipici compresi nel seguente gruppo:

- deposizione di placche di proteina  $\beta$ -amiloide,
- iperfosforilazione della proteina tau,
- infiltrazione di cellule infiammatorie.

14. Cellule derivate dall'animale transgenico secondo la rivendicazione

1.

15. Uso delle cellule secondo la rivendicazione 14 per la selezione di molecole attive nelle patologie neurodegenerative.

16. Uso delle cellule secondo la rivendicazione 14 per la selezione di molecole attive nelle patologie muscolari.

17. Metodo per la preparazione di un animale transgenico non umano secondo la rivendicazione 1 che comprende essenzialmente le fasi di:

a) preparazione di una linea progenitrice animale non umana, transgenica per la catena leggera dell'anticorpo monoclonale anti-NGF e di una linea progenitrice animale non umana, transgenica per la catena pesante dell'anticorpo anti-NGF,

b) incrocio delle due linee animali transgeniche progenitrici

c) selezione della prole.

18. Metodo secondo la rivendicazione 17 dove la fase a) consiste essenzialmente nell'introduzione dell'unità trascrizionale contenente il transgene codificante per la catena leggera dell'anticorpo anti-NGF e dell'unità trascrizionale contenente il transgene codificante per la catena pesante dell'anticorpo anti-NGF, separatamente, in diversi oociti fecondati e nella selezione di progenitori transgenici per uno o per l'altro transgene.

19. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle patologie legate ad un deficit di NGF.

20. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 19 dove tale deficit e' dovuto alla presenza di auto-anticorpi anti-NGF.

21. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 come modello per

lo studio delle sindromi neurodegenerative.

22. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 21 dove la sindrome neurodegenerativa e' la malattia di Alzheimer.

23. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle patologie dell'apparato muscolare.

24. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 per la selezione di sostanze efficaci nella cura di patologie comprese nel seguente gruppo:

- sindromi neurodegenerative

- atrofia/distrofia muscolare

25. Uso dell'animale transgenico della rivendicazione 24 dove la sindrome neurodegenerativa e' la malattia di Alzheimer.

26. Uso dell'NGF (Nerve Growth Factor), o di suoi frammenti peptidici, per la preparazione di composizioni farmaceutiche per il trattamento di patologie muscolari.

27. Uso dell'NGF secondo la rivendicazione 26 dove l'NGF viene fornito in una delle seguenti forme:

- NGF naturale

- NGF ricombinante

- NGF sintetico

- NGF secreto da impianto di cellule geneticamente ingegnerizzate

- NGF codificato da vettori virali.

28. Uso dell'NGF secondo la rivendicazione 27 dove tale trattamento avviene per somministrazione locale.

29. Composizioni farmaceutiche comprendenti NGF (Nerve Growth



1904PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Factor) per la terapia delle patologie muscolari.

(MER/pd)

Milano, li 6 Agosto 1999

p. S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

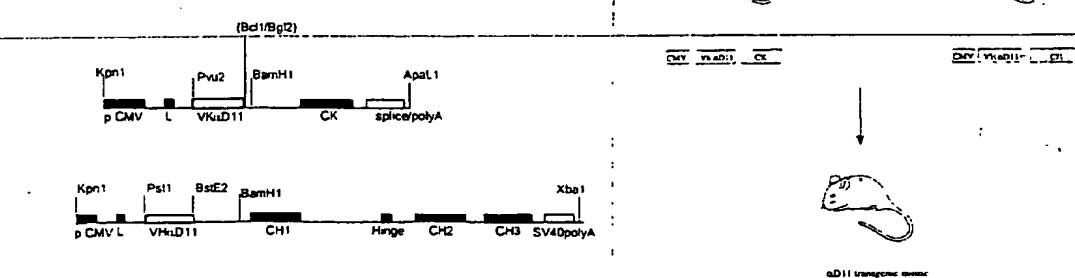
il Mandatario



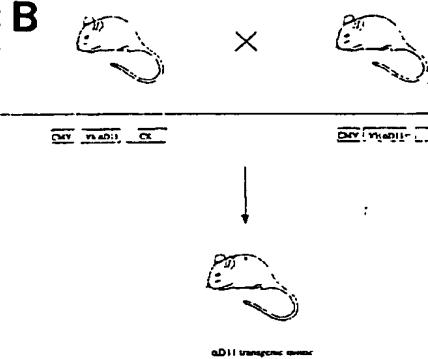
Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

A



B



C

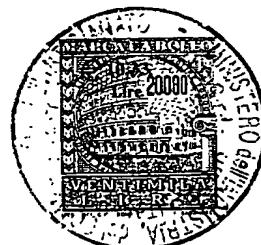
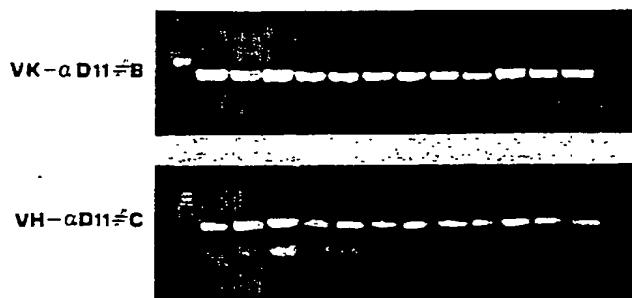


FIG. 1

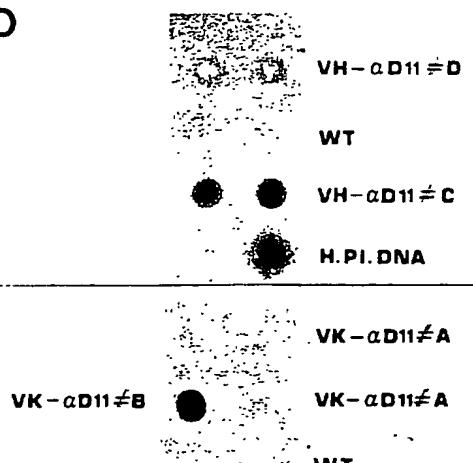
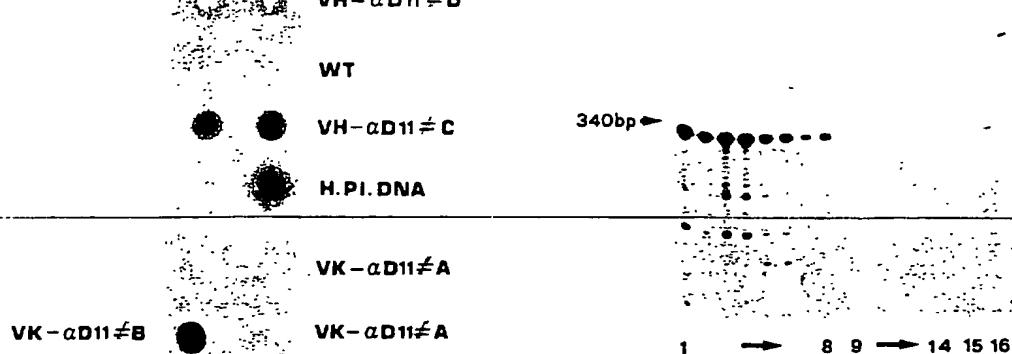
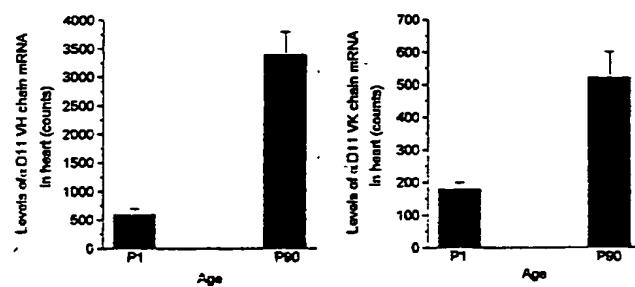
**D****E****F**

FIG. 1 CONT

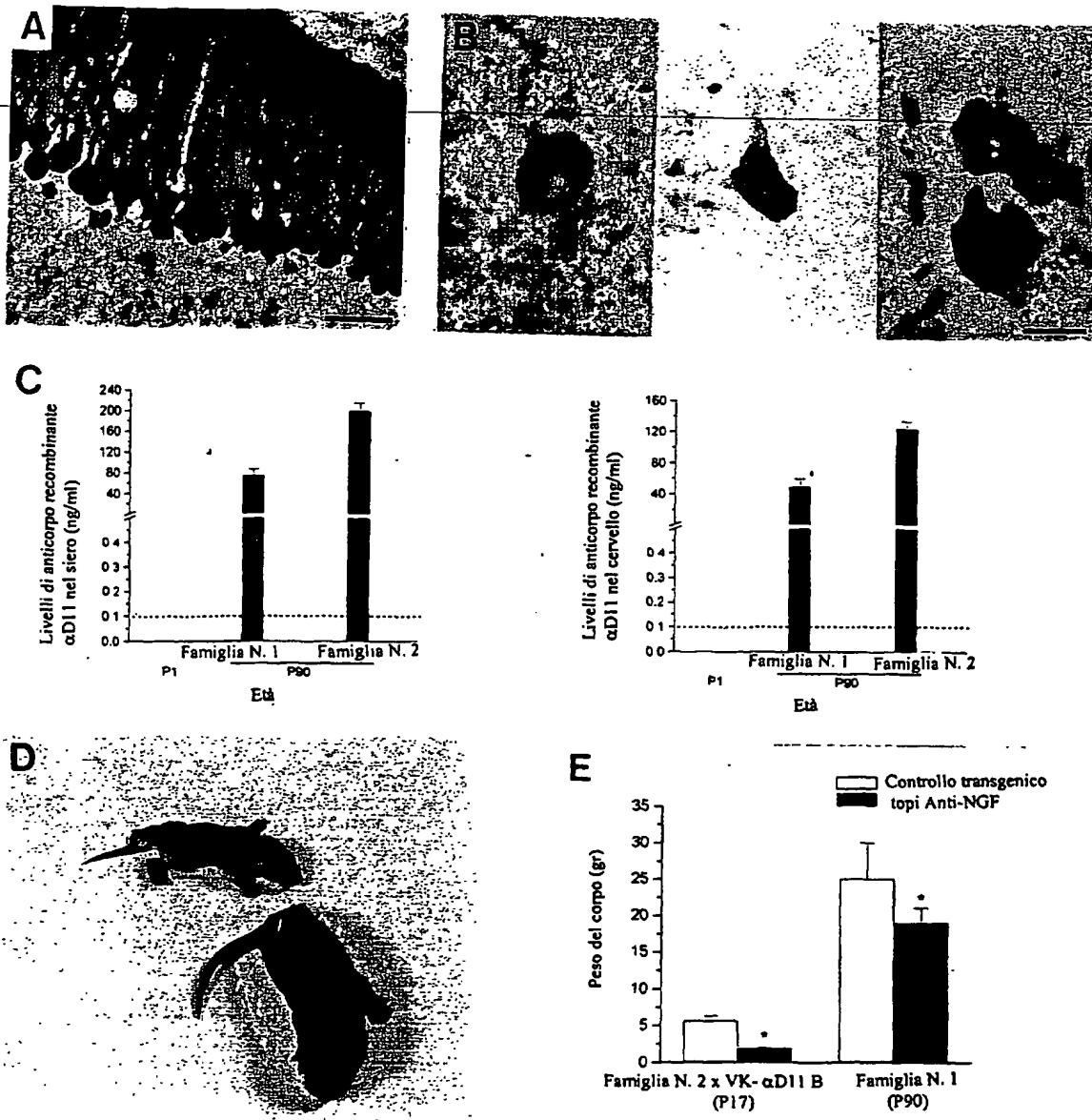


FIG. 2

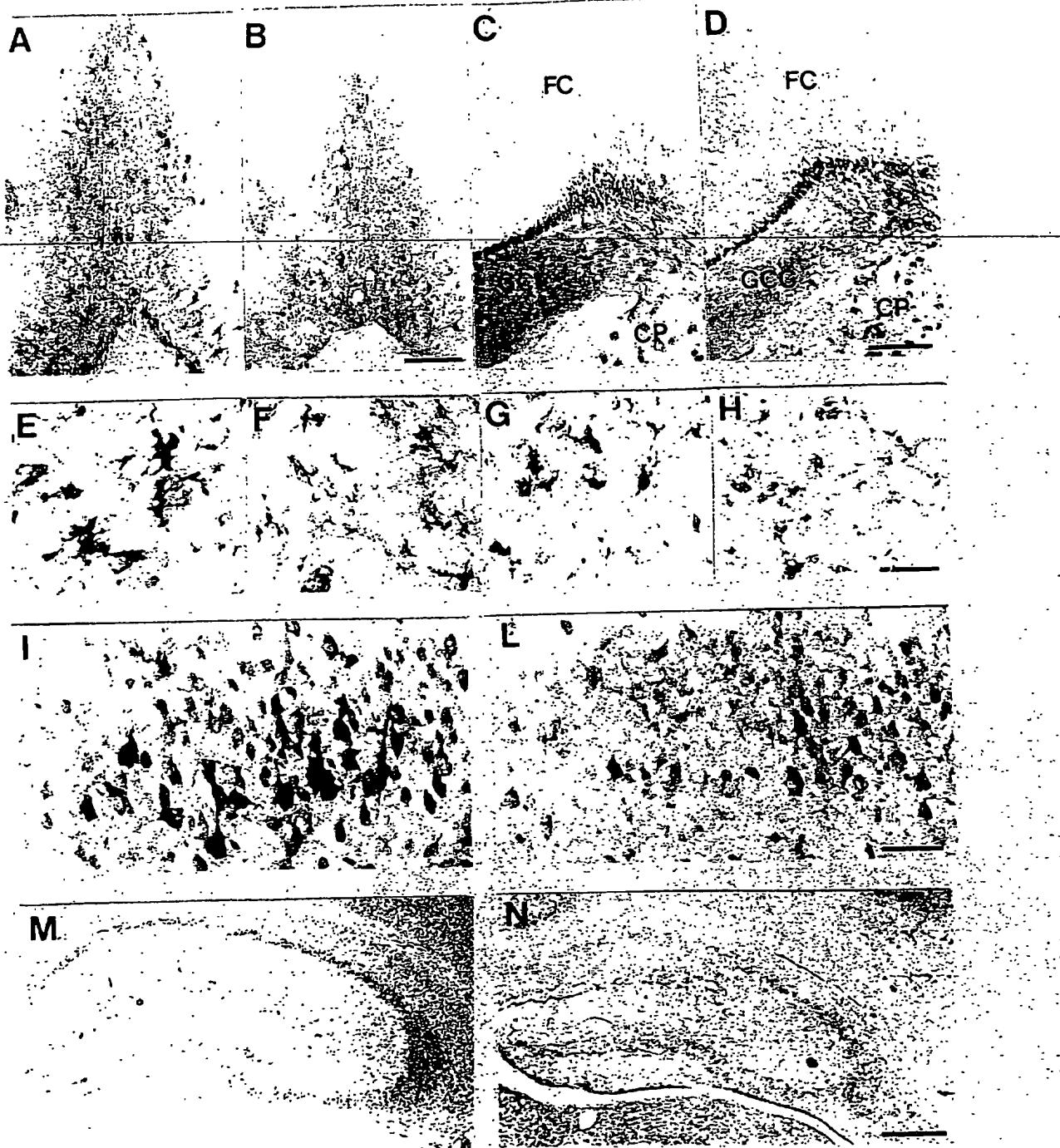


FIG. 3

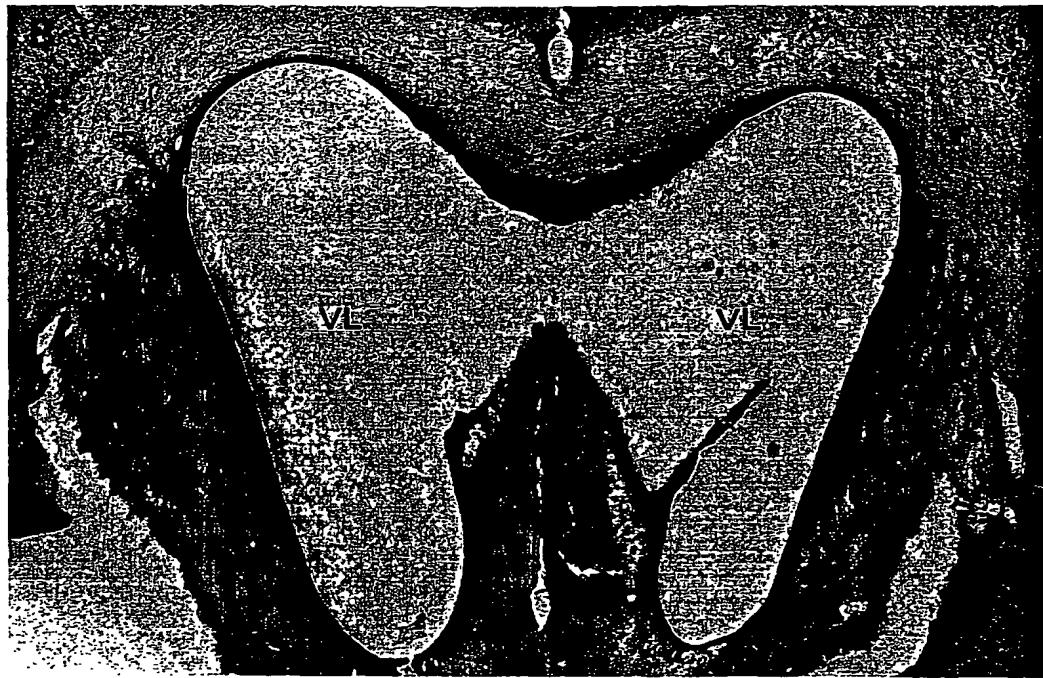
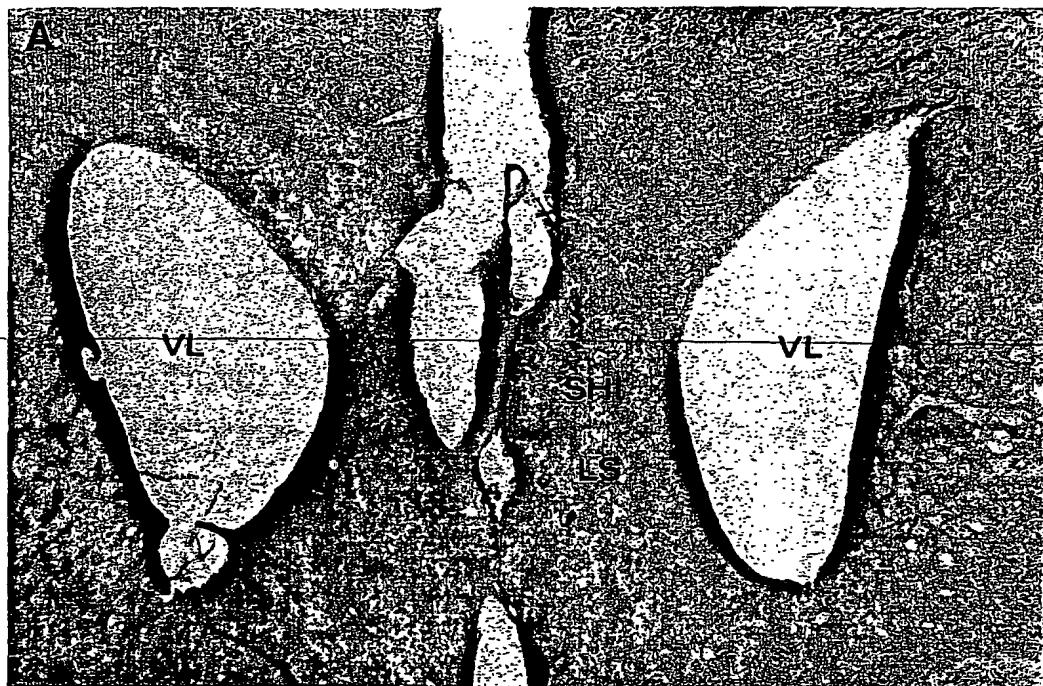
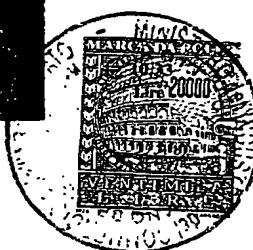
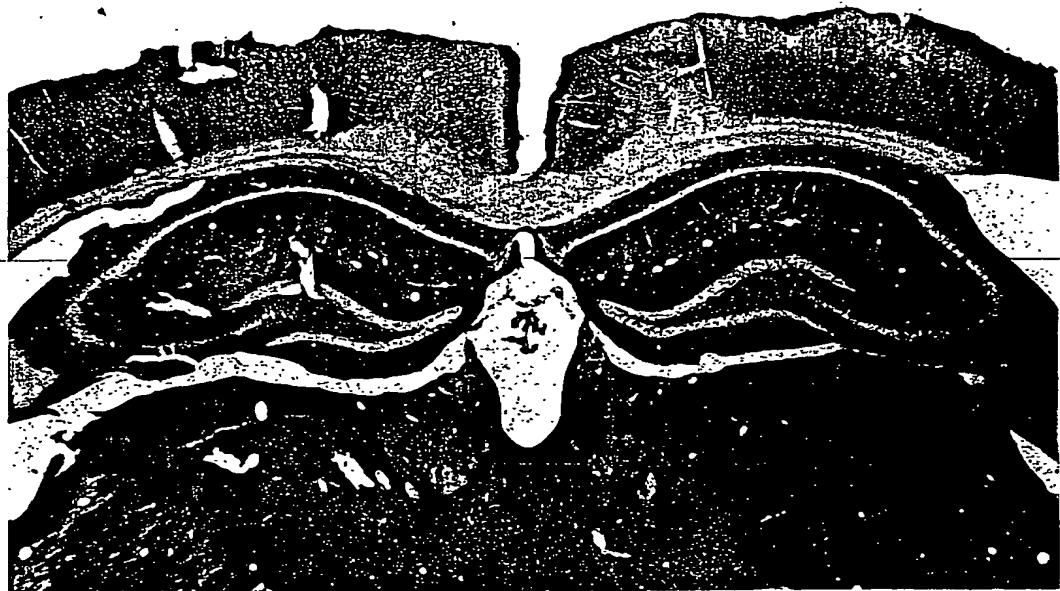


FIG. 4



A



B

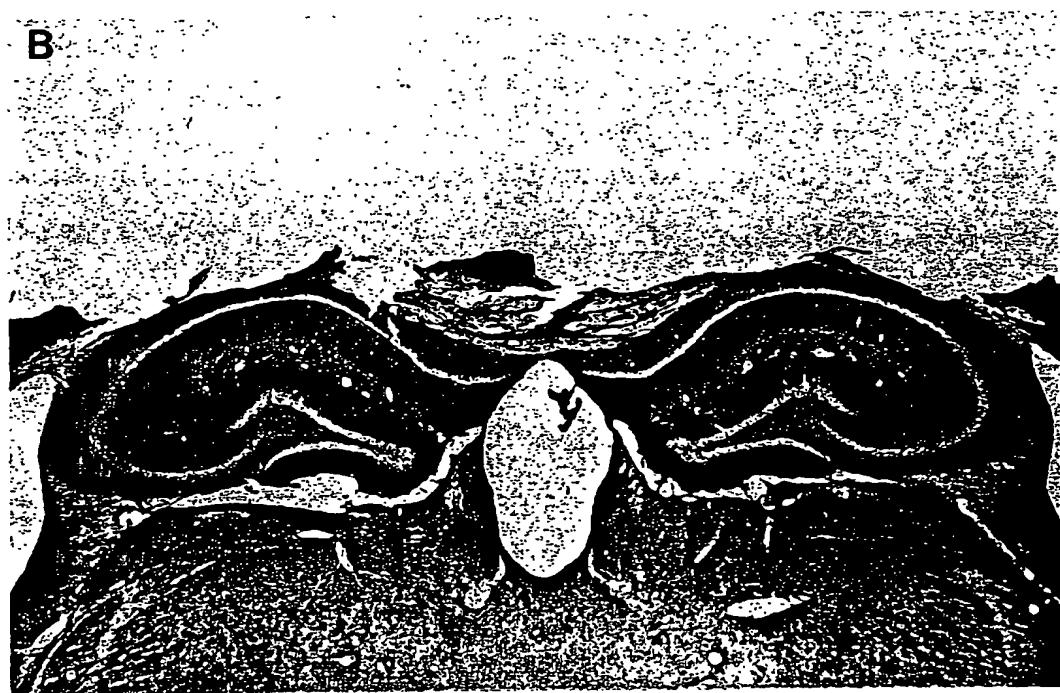


FIG. 5

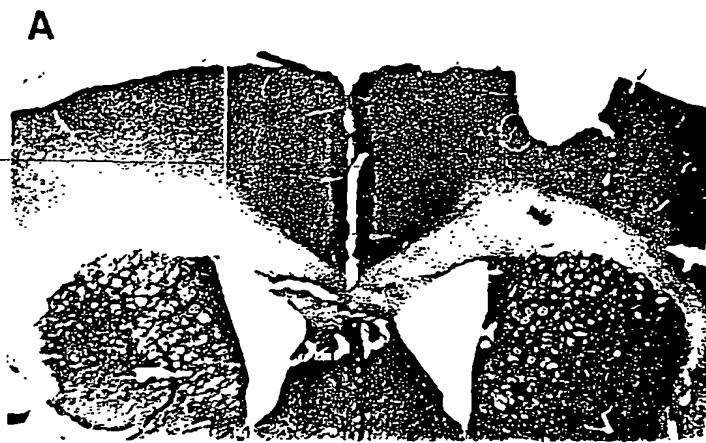


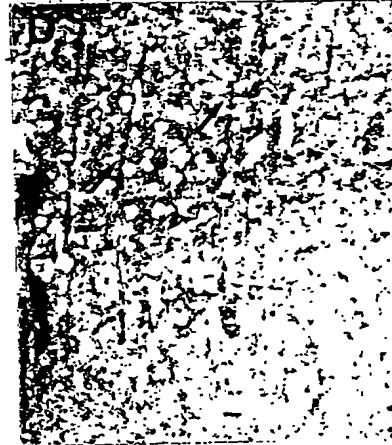
FIG. 6

**A**

**B**

FIG. 7

A



E

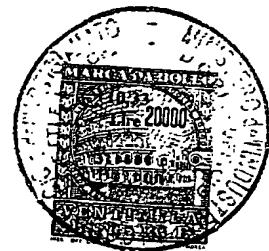
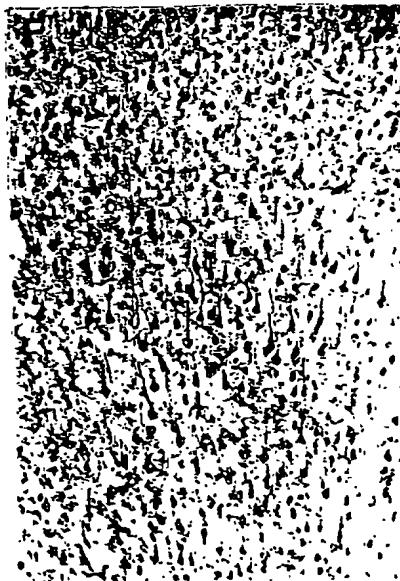
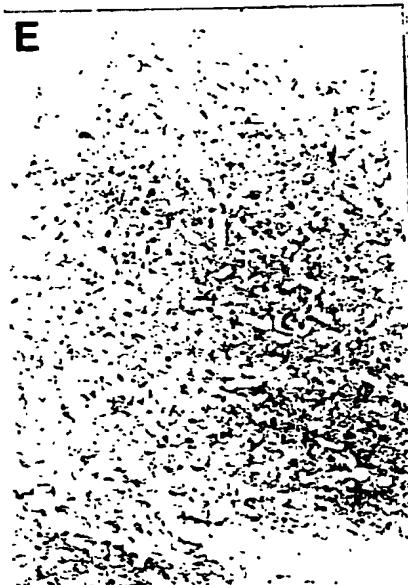


FIG. 8

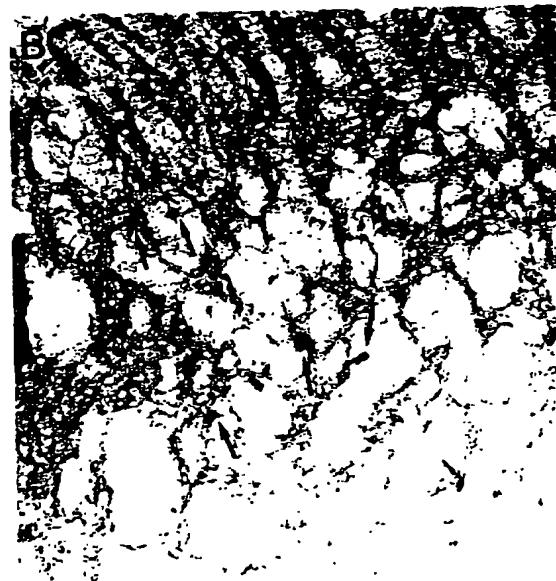


FIG. 9

440-00176

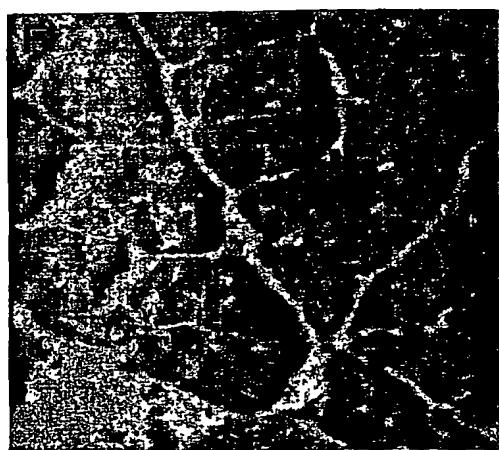
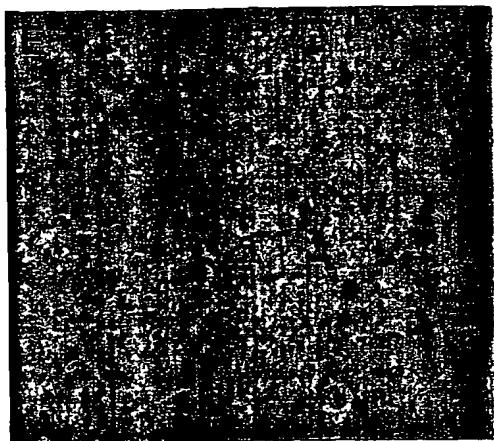
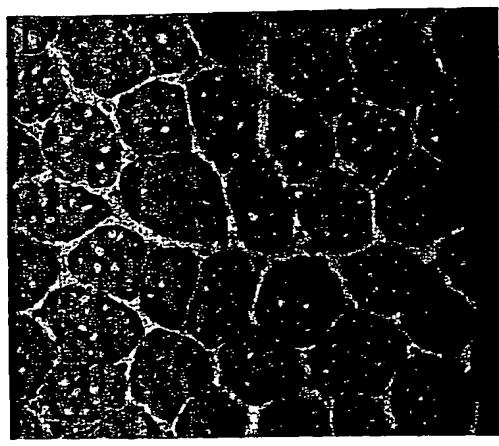
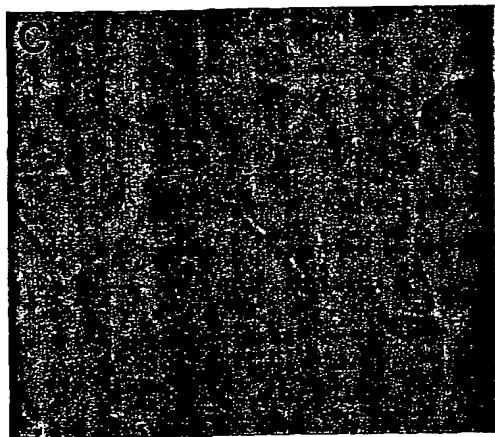
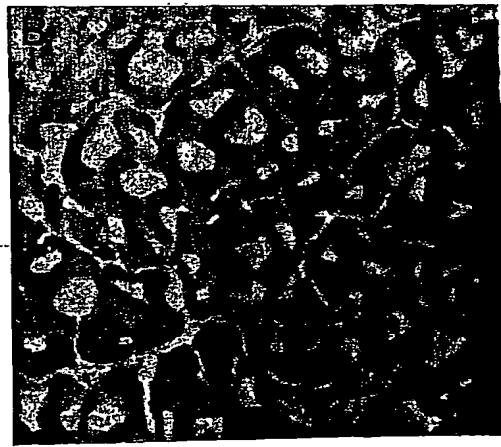
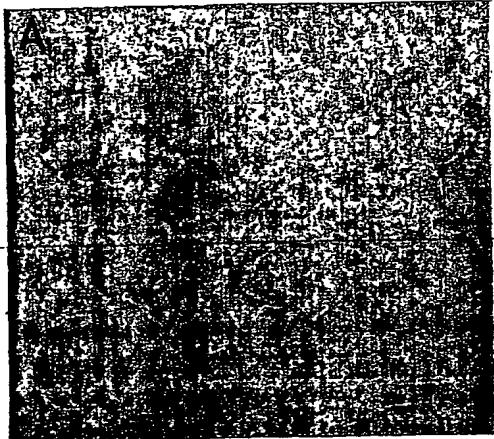


FIG. 10

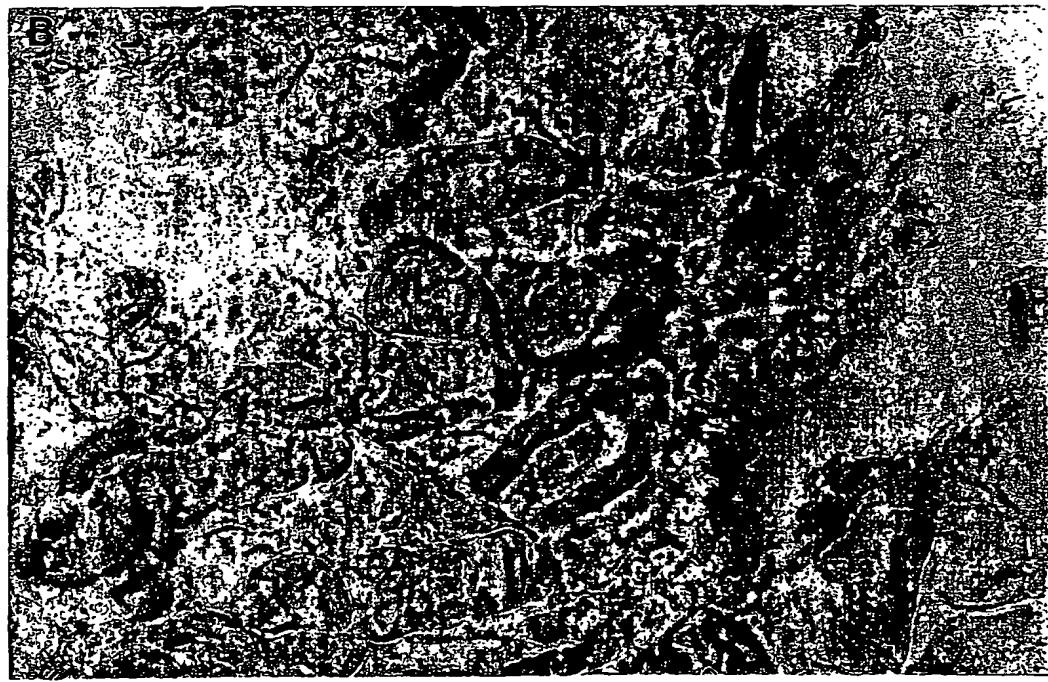
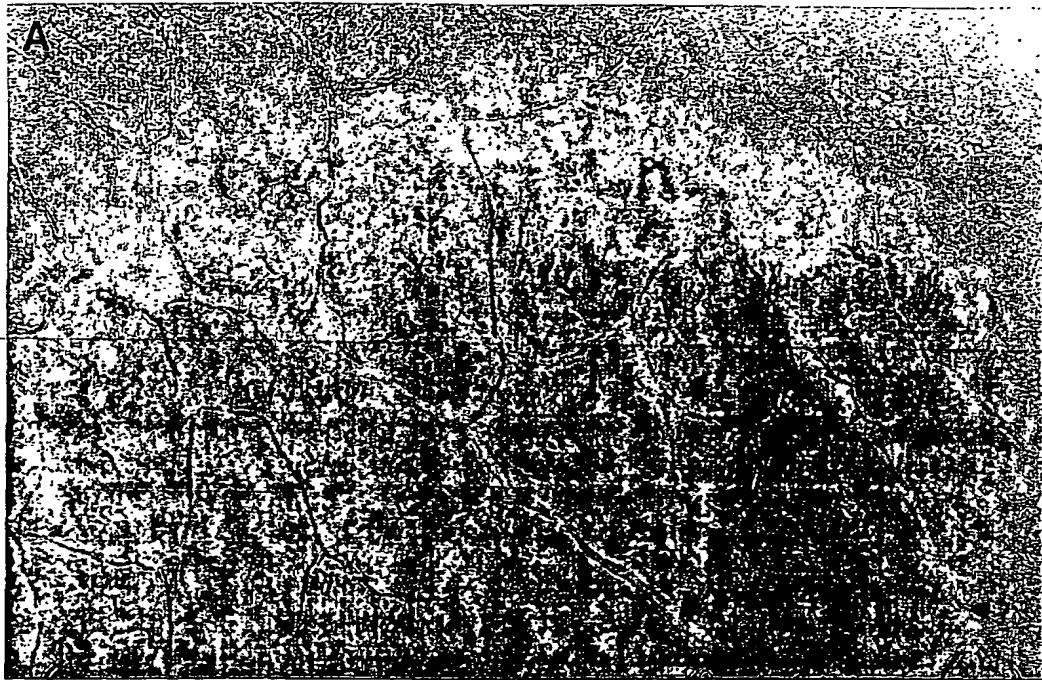


FIG. 11

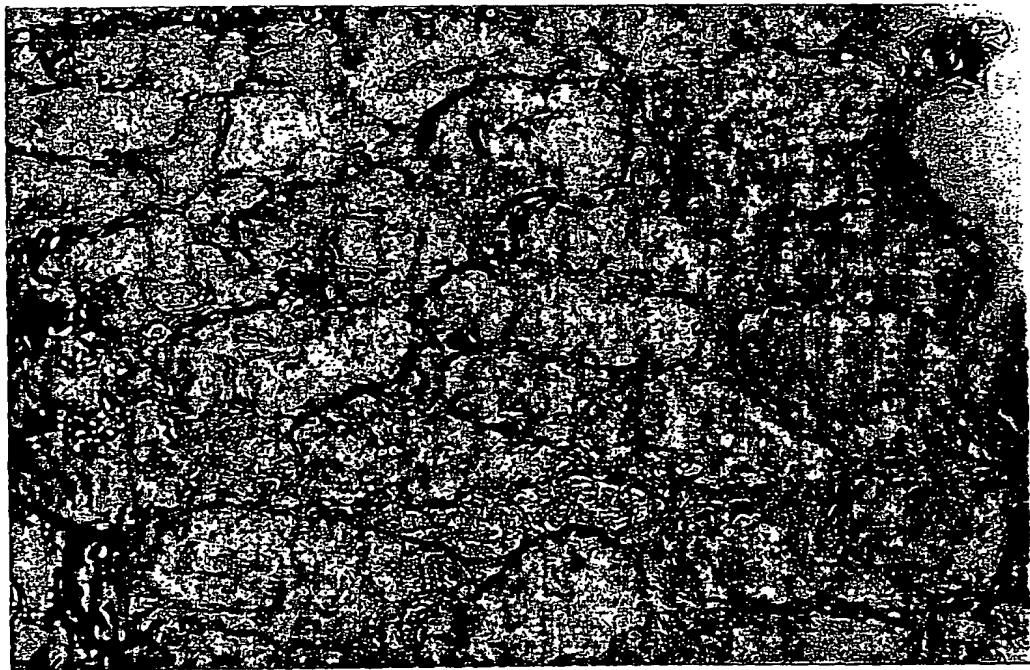
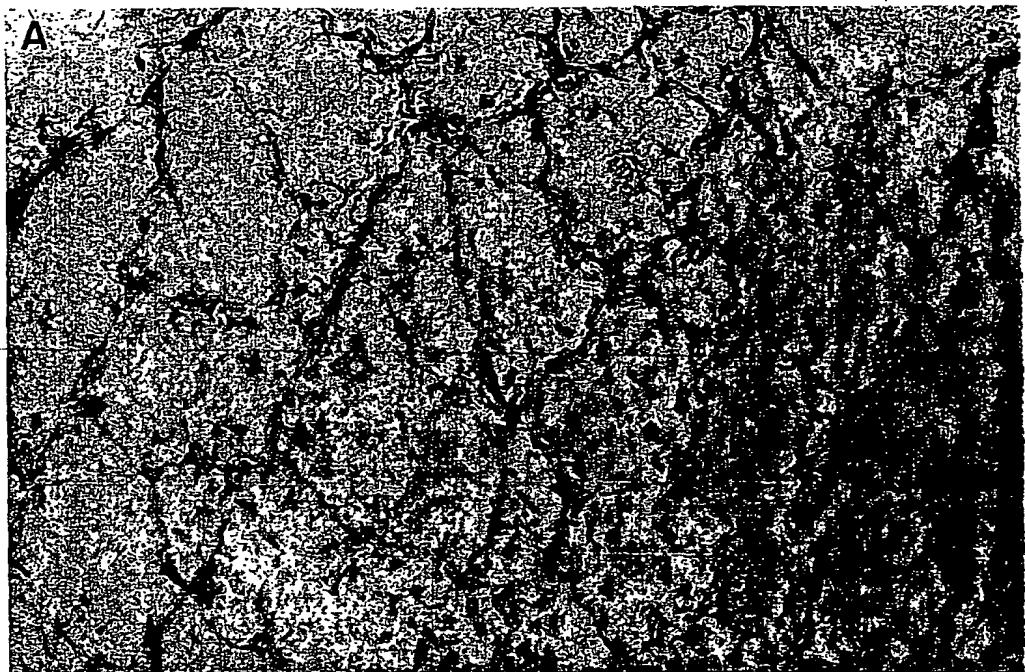


FIG. 12



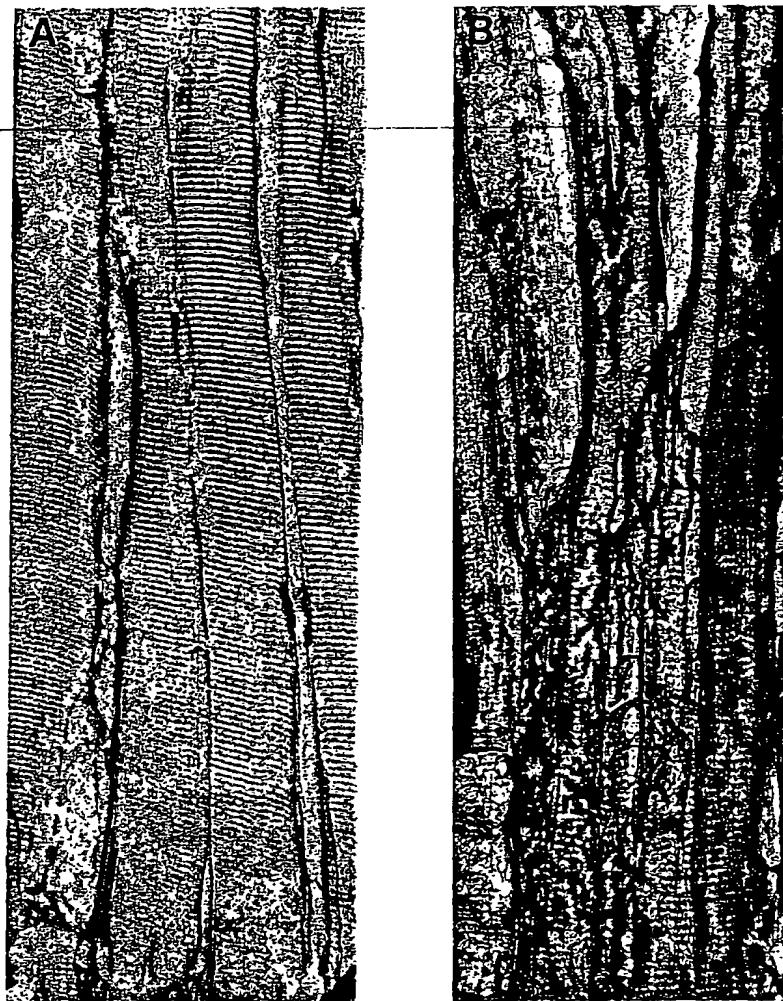


FIG. 13

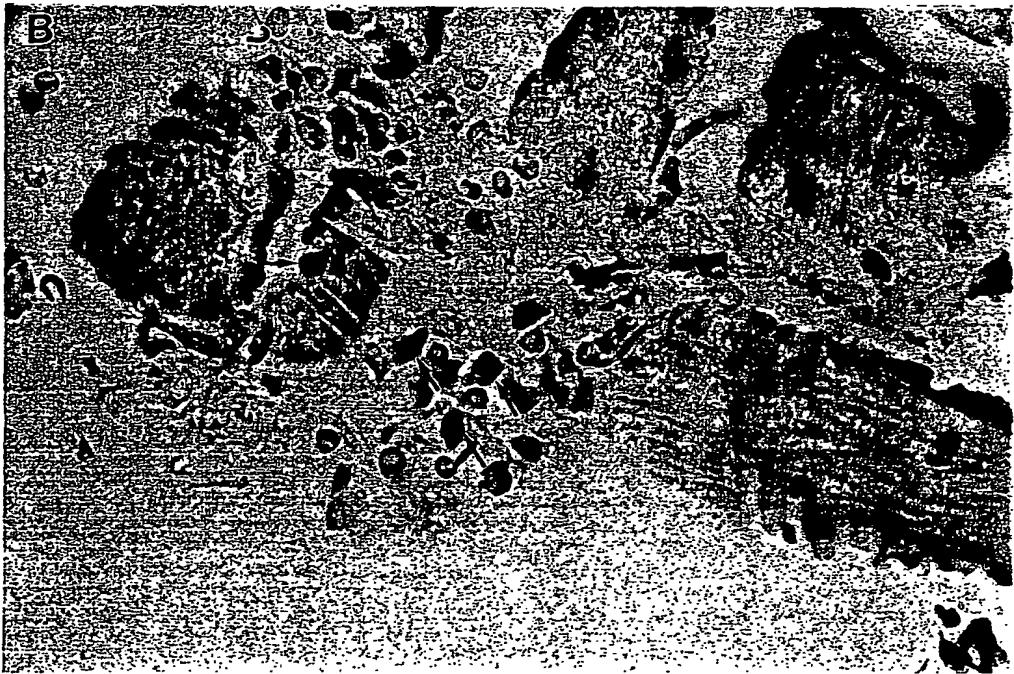
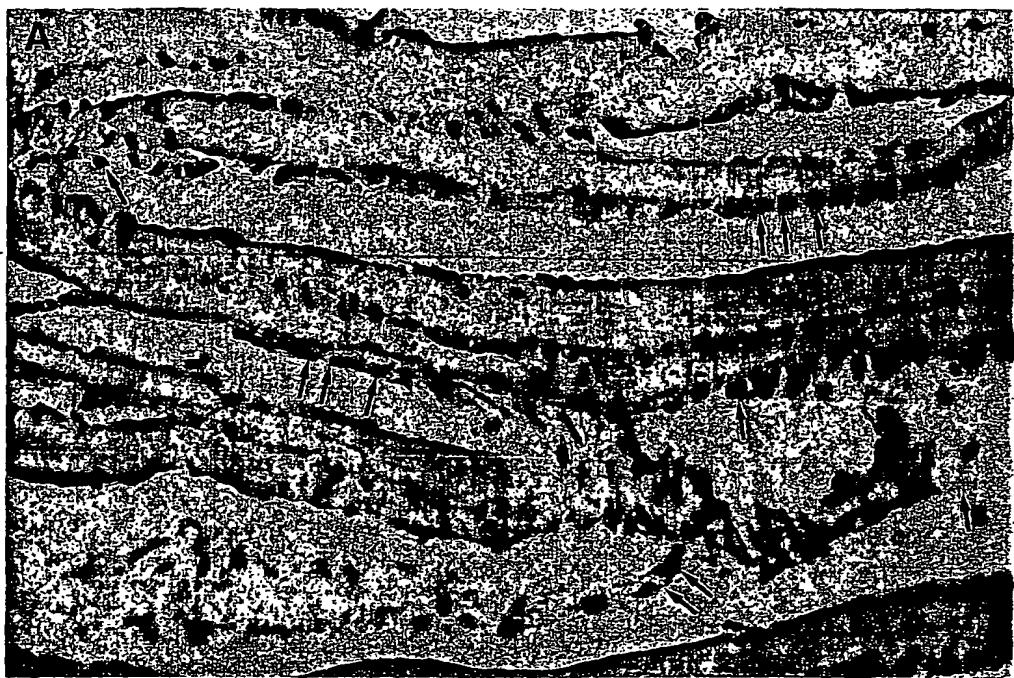


FIG. 14



FIG. 15

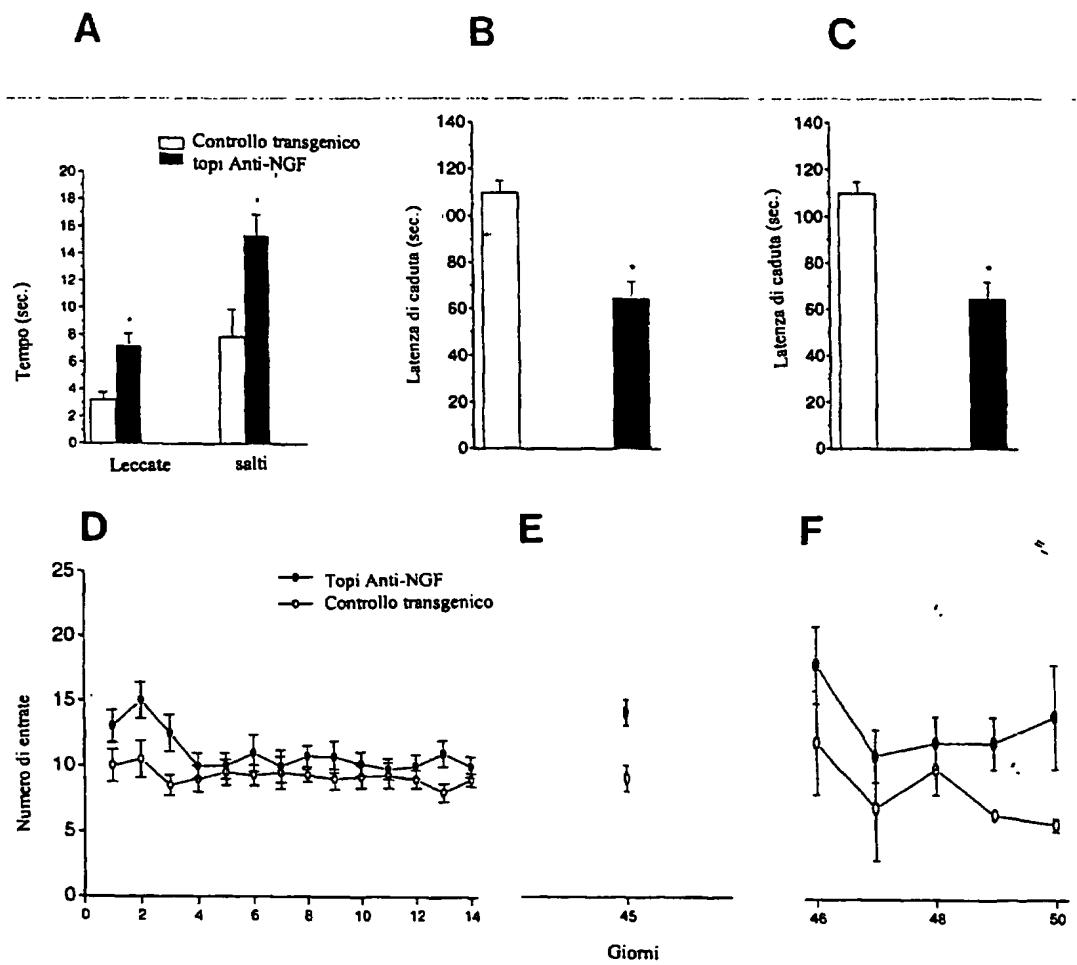
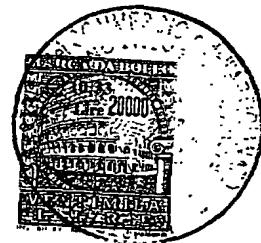
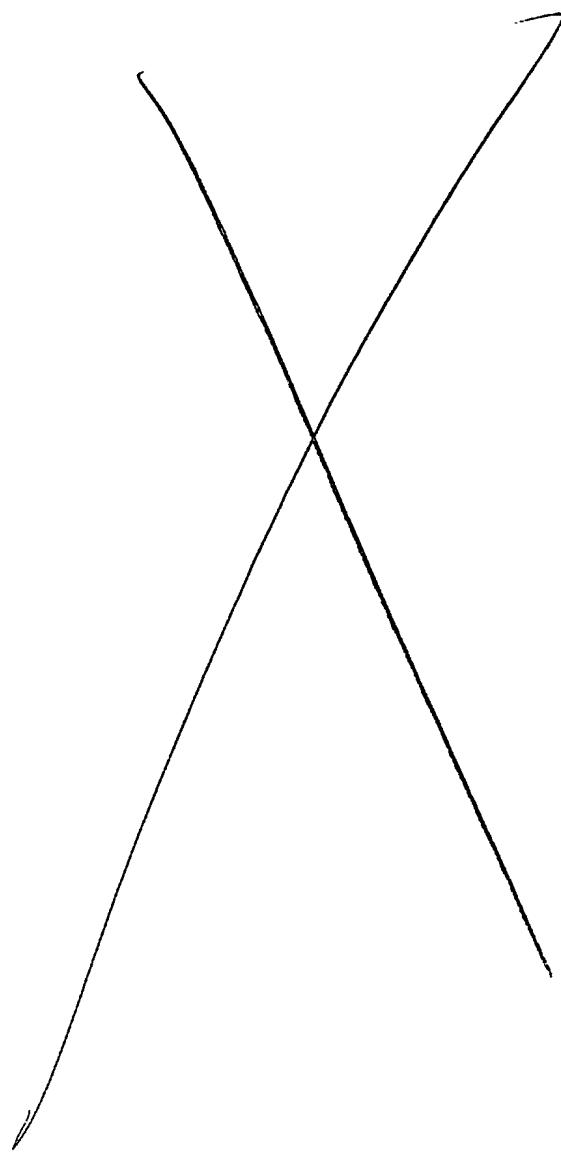


FIG. 16





1904PTIT

**RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE**

#### NUVECC DEMANDS

REG 4

**DATA DI DEPOSITO**

**NUMERO BREVETTO**

### DATA DE DEPOSIATO

9: 860, 1995

1840-1850

**B. ~~TYPE~~ TITLE**

Animals transgenic for mouse anti-NCF

## Non-human anti-NGF transgenic animals

1. ~~INTRODUCTION~~ ABSTRACT

The present invention discloses a non-human transgenic animal that ubiquitously expresses a neutralising anti-NGF antibody. Also disclosed are the method of preparation of the transgenic animal and the use of this model of phenotype knockout to evaluate the pleiotropic effects of the NGF. A further aspect of the invention relates to the use of the transgenic mouse as an animal model for neurodegenerative syndromes, both associated and not associated with muscular pathologies such as Alzheimer's disease, and the use thereof for selecting compounds that are able to arrest neuronal degeneration or the loss of muscle function. A further aspect of the present invention relates to the local use of NGFs to correct muscular pathologies and cholinergic deficit at the cerebral level.

**M. DISEGNO**



Description of the invention:

“Non-human anti-NGF transgenic animals”

in the name of: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

5 based in: Trieste

Designated inventors: Cattaneo Antonino, Capsoni Simona, Roberti Francesca

Filed on August 6, 1999 with the number MI99A001783

-----

10 Background of the invention

The Nerve Growth Factor (NGF) (Levi-Montalcini, 1952) is a pleiotropic neurotrophin having a fundamental role in the neuronal differentiation of both central and peripheral nervous system. Accordingly, NGF is essential for the differentiation of cholinergic neurons of the basal forebrain, of the sensory and sympathetic neurons.

15 NGF now also appears to be necessary in post-differentiation steps, as it is able to modulate cellular apoptosis (Davies, 1992), the synthesis of cytoskeletal elements during axonal regeneration (Snider, 1989), the synthesis of enzymatic and peptidic neurotransmitters (Eide et al., 1993), synaptic rearrangements and neuronal proliferation (Schnell et al., 1994) and to thus play a fundamental role also in neurodegenerative processes and neuronal ageing (Connor & Dragunow, 1998).

20 The mechanisms of action regulating such different activities are yet to be clarified: the pleiotropic activity of NGF and the unavailability of adult animal models do not allow to correlate its expression to a unique 25 and definite phenotype or to a determined and recognisable function. The inactivation of NGF in adult animal models has been attempted by

different approaches, among which immunoneutralisation by systemic delivery of anti-NGF neutralising antibodies (Levi-Montalcini et al., 1960) or by gene knockout in transgenic mice (Crowley et al., 1994). However, in both cases the results were rather disappointing, because in the first 5 approach the systemically delivered antibodies do not cross the blood-brain barrier and the effect of NGF neutralization in other districts depends on many additional factors which are not easily standardised, such as the antibody titre and affinity, the clearance rate or the cross-reactivity of the antibody with other neurotrophins, etc.

10 On the other hand the molecular inactivation approach in «knockout» mice has confirmed the importance of this neurotrophin and the non redundancy of its intracellular signalling system, but it has failed to provide the expected adult model for the study of NGF: indeed *ngf*<sup>-/-</sup> transgenic mice die shortly after birth, before the development of a 15 degenerative pathology. The phenotype of *ngf*<sup>+/-</sup> heterozygotic mice was also not very instructive for studying the pathologies associated with NGF deficit in adult: heterozygous mouse NGF level is only 25 % lower than in the control mouse, has only a mild cholinergic phenotype, without apparent anomalies related to human neurodegenerative pathologies.

20 However, different lines of experimental data suggest that NGF plays a key role in neurodegenerative syndromes (Connor & Dragunow, 1988). Senile dementia and Alzheimer's disease (AD) are neurodegenerative syndromes characterised by progressive dementia. Alzheimer's disease affects 5% of about 70-year old people and more than 30% of about 25 80-years old people. The incidence thereof, due to the improvement of living

conditions and lengthening of average life expectancy, is destined to double in the next thirty years. The social costs of such pathology are very high.

Alzheimer's disease first affects the neurons of the cerebral cortex and is

5 characterised both by clinical symptoms (for example, the progressive loss of cognitive capacities) and by characteristic pathological hallmarks (which can be diagnosed only post-mortem), such as the formation of extracellular plaques of  $\beta$ -amyloid protein, neurofibrillar intracellular aggregates consisting of hyperphosphorylated tau protein, and «neuronal

10 loss» (Goedert, 1993; Mandelkow and Mandelkow, 1993; Selkoe, 1994).

Furthermore, Alzheimer's disease is associated with motor disorders due to the loss of cognitive capacity and coordination, as well as to pathologies of skeletal muscles such as amyloid deposition in skeletal muscle cells (Fukuchi et al., 1998; Jin et al., 1998). It is interesting to point out that

15 NGF further exerts a function on non-neuronal cells, this observation is confirmed by the presence of NGF receptors with low and high affinity (p75, TrkA) also on muscular cells, and the discovery of various isoforms of the TrkA receptor that are apparently not expressed in the nervous system.

20 In the central nervous system, the cholinergic system is particularly affected. This results in a decrease of acetylcholine synthesis by cholinergic neurons of the basal forebrain and a selective loss of said neurons. Cholinergic neurons are dependent on NGF which acts through high (TrkA) and low affinity (p75) receptors.

In spite of enormous investments made by public and above all by private-sector bodies, up to now neither an early diagnosis nor a suitable therapy exist. This is due, above all, to the unavailability of experimental cellular or animal models that mimic in a complete way the aberrant 5 neuropathological structures.

During recent years different transgenic models have been proposed, to define the aetiopathogenesis of Alzheimer's disease and to select useful compounds for treating the disease. Based on the histological, immunological, and molecular hallmarks of Alzheimer's disease, such as 10 the presence of deposits of  $\beta$ -amyloid protein in the central nervous system, in particular at the level of the cerebral cortex and the hippocampus, transgenic animals were obtained in which the wild-type  $\beta$ -amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) is expressed at levels higher than the endogenous one, or is expressed in a mutated form found in the genetic 15 forms of the disease (Hsiao, WO 97/87492 and Games, WO 96/40896).

Other proposed transgenic models relate to animals wherein the transgene is the presenilin-1 or -2 (Citron et al., 1996; Strchler-Pierrat et al., 1997), alone or together with the amyloid precursor protein (APP) (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Wong et al., 1999), the tau 20 protein (Gotz et al., 1995; Brion et al., 1999) or the bPP protein C-99 fragment (Jin et al., 1998).

However so far all proposed models develop only some of the morphological, histological or molecular markers defined as characteristic

of the diagnosis of Alzheimer's disease and therefore do not represent complete models.

#### Summary of the Invention

In the present invention a non-human transgenic animal that  
5 express ubiquitously an anti-NGF neutralising antibody is disclosed. Further is disclosed the method of preparation of the transgenic animal and the use of this model of phenotypic knockout to evaluate NGF pleiotropic effects. A further aspect of the invention relates to the use of the transgenic mouse as animal model for neurodegenerative syndromes,  
10 associated or not to muscle pathologies, as Alzheimer's disease and the use thereof for the selection of the drugs able to block neuronal degeneration or loss of muscle activity. A further aspect of the present invention relates to the local use of NGF to correct muscle pathologies and cholinergic deficit at brain level

#### 15 Detailed Description of the Invention

The present invention describes a non-human transgenic animal that expresses an anti-NGF (Nerve Growth Factor) neutralising antibody. The antibody used ( $\alpha$ D11) binds NGF at an epitope responsible for the binding with the high affinity receptor thereof, TrkA, thus blocking the  
20 binding thereof and therefore it acts as a neutralising antibody. The epitope recognised by  $\alpha$ D11 antibody (corresponding to the amino acids 41-49 of NGF) corresponds to a very conserved sequence in the neurotrophins family and therefore it is NGF specific. Alternatively, antibodies able to block the intracellular "signalling" can be used.

Alternatively the recombinant antibody can be in the Fab, Fv or single chain Fv form.

Surprisingly, it was found that transgenic mice for anti-NGF antibodies, which do not express appreciable levels of the antibody in the period 5 immediately after birth and which express such antibody at levels between 50 and 500 ng/ml in the adult period, develop a complex pathological picture whose main characteristics are:

- 1) muscle dystrophy, particularly at the level of the rear limbs;
- 2) dilatation of the cerebral ventricles, a symptom that is often used in 10 clinics as an indication of neurodegenerative diseases, like Alzheimer's disease (Luxenberg et al., 1987);
- 3) atrophy of the cerebral cortex associated in certain cases with the complete disappearance of the hippocampus;
- 4) loss of neurons and/or apoptosis, symptom related to Alzheimer's 15 disease (Mizutani et al., 1990);
- 5) deposition in the CNS of plaques of  $\beta$ -amyloid protein, at level of the *para-cingular cortex and neostriatum*;
- 6) deposition of plaques of  $\beta$ -amyloid protein in the skeletal muscle;
- 7) cognitive deficits characterised by defects in "working memory" and 20 spatial orientation deficits;
- 8) cholinergic deficit;
- 9) hyperphosphorylation of the tau protein at brain level;
- 10) hyperphosphorylation of the tau protein in the muscle;
- 11) infiltration of inflammatory cells in the muscle;

12) modifications of the sympathetic innervation of the spleen and reduction of splenocyte vitality.

An aspect of the present invention relates to the anti-NGF transgenic animal as a model for studying the pathologies induced by NGF deprivation. NGF deprivation at systemic level can result in various aetiologies, also of autoimmune type. At local level, a lack or limited availability of NGF from target cells can be caused, for example, by traumatic events (denervation).

Surprisingly, many characteristics of the transgenic animal model disclosed in the present invention are completely assimilable to those presented at macroscopic, histological and molecular level by Alzheimer patients. The present invention therefore provides a non-human transgenic animal model to study Alzheimer's disease. The characteristics of this model are summarised in table 1 where they are compared with those of other transgenic animals proposed for this disease. As it is clear from table 1, the transgenic animal of the present invention exhibits characteristics which, as a whole, have never been observed in animal models provided up to now (Hsiao et al. 1996 and WO 95/20666 and WO 97/48792; Citron et al., 1997; Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Wong et al., 1999; Gotz et al., 1995; Brion et al., 1999; Jin et al., 1998; Games et al., 1995; Irizzary et al. 1997).

Table 1

|   | Transgenic mouse for APP <sup>5, 9, 10</sup> | Transgenic mouse for PS-1 <sup>2</sup> | Transgenic mouse for APP and PS-1 <sup>3, 4, 5</sup> | Transgenic mouse for human mutated tau protein <sup>6</sup> | Transgenic mouse for human mutated tau protein <sup>7</sup> | Transgenic mouse for C-99 fragment of $\beta$ PP <sup>8</sup> | Transgenic mouse for anti-NGF antibodies (anti-NGF mouse) |
|---|--|--|--|---|---|---|---|
| <b>DEFICIT</b>  |  |  |  |   |   |   |   |
| Brain dimensions  | -  | -                                      | -  | -   | -   | -   | ++  |
| Thickness reduction of cerebral cortex                        | -  | -                                      | -  | -   | -   | -   | +++   |
| Cerebellum atrophy  | -  | -                                      | -  | -   | -   | -   | +++   |
| Dilatation of cerebral ventricles                             | -  | -                                      | -  | -   | -   | -   | +++   |
| Memory and orientation deficits                               | ++   | -                                      | -  | -   | -   | -   | +++   |
| Neuronal loss   | -  | -                                      | -  | -   | -   | -   | ++  |
| Apoptosis   | -  | -                                      | -  | -   | -   | -   | ++  |
| Amyloid plaques   | ++   | ++                                     | +++  | -   | -   | -   | ++  |
| Tau hyperphosphorylation                                      | -  | -                                      | -  | ++  | ++  | -   | ++  |
| Neurofibrillary tangles/neuropil threads                      | ++   | -                                      | -  | +   | +   | -   | +++   |
| Activation of the microglia cells                             | -  | -                                      | -  | -   | -   | -   | ++  |
| Cholinergic deficit   | +  | -                                      | +  | -   | -   | -   | +++   |
| Atrophy of the skeletal muscles                               | -  | -                                      | -  | -   | -   | ++  | +++   |
| Amyloid deposits in the skeletal muscles (Congo red staining) | -  | -                                      | -  | -   | -   | ++  | +++   |

|   | Transgenic mouse for APP <sup>5, 10</sup> | Transgenic mouse for PS-1 <sup>2</sup> | Transgenic mouse for APP and PS-1 <sup>3, 4, 5</sup> | Transgenic mouse for human mutated tau protein <sup>6</sup> | Transgenic mouse for human mutated tau protein <sup>7</sup> | Transgenic mouse for C-99 fragment of $\beta$ PP <sup>8</sup> | Transgenic mouse for anti-NGF antibodies (anti-NGF mouse) |
|---|---|--|--|---|---|---|---|
| DEFICIT   |   |  |  |   |   |   |   |
| Amyloid deposits in the skeletal muscle (anti-APP IH)           | -   | -                                      | -  | -   | -   | ++  | ++  |
| Hyperphosphorylated tau in the muscle (IH)                      | -   | -                                      | -  | -   | -   | -   | +   |
| Macrophage infiltration   | -   | -                                      | -  | -   | -   | +++   | +++   |
| Vacuolization of muscle fibres                                  | -   | -                                      | -  | -   | -   | +++   | ++  |
| Increase in the number of nuclei in central position (myofibre) | -   | -                                      | -  | -   | -   | ++  | ++  |

<sup>1</sup>Hsiao et al. 1996.

<sup>2</sup>Citron et al., 1997.

<sup>3</sup>Borchelt et al., 1997.

5 <sup>4</sup>Holcomb et al., 1998.

<sup>5</sup>Wong et al., 1999.

<sup>6</sup>Gotz et al., 1995.

<sup>7</sup>Brion et al., 1999.

<sup>8</sup>Jin et al., 1998.

10 <sup>9</sup>Games et al., 1995.

<sup>10</sup>Irizzary et al. 1997.

Thus it is clear that the transgenic animal of the present invention constitutes a much more complete animal model for Alzheimer's disease than those proposed up to now. Indeed the deficits recognised in the anti-NGF mouse, resulting from the transgene expression, are at level of both 5 the central and peripheral nervous systems, at cognitive level, at muscle level and further at morphological-functional level in the spleen in which anomalies in the expression pattern of the immunoglobulins can be found. In this regard are particularly interesting the ever-increasing experimental evidence indicating as central the role played by the immune system in the 10 development of Alzheimer's disease (Kalaria, 1993).

The preparation of the transgenic animal is carried out by crossbreeding two strains of parent transgenic mice (progenitors), one of which is transgenic for the heavy chain of an anti-NGF antibody and the other for the light chain, and this method of preparation is a further aspect of the 15 present invention. The two lines of parent transgenic animals are prepared by microinjection of plasmid DNA in ES cells or oocyte fecundated according to standard methods known by those skilled in the art.

In general, the plasmid vectors containing the transcription units for the cDNA expression of one or the other of the 2 immunoglobulin chains are 20 purified, for example by banding using a CsCl continuous gradient, then diluted by physiological solutions. The vectors can be injected as such into the pro-nucleus of fecundated oocytes, can be linearized by enzymatic restriction in a unique site or the transcription units can be separated from the vector by enzymatic restriction, purified, for example by gel 25 electrophoresis or ion exchange chromatography, and separately

introduced into the pronuclei. Preferably murine oocyte is used, more preferably it is from B6SJL strain.

The two immunoglobulin chains of the anti-NGF antibody can be chimeric, obtained by assembling the variable murine regions of an anti-NGF 5 monoclonal antibody, like Mab  $\alpha$ D11, having constant human regions of K light and  $\gamma$ 1 heavy chains, as disclosed in the present invention or derived as such from the specific cDNA of the secreting hybridoma. The expression of the two antibody chains in the transgenic mouse is controlled by a strong or viral promoter, such as CMV-IE (Cytomegalovirus 10 Immediate Early), which is expressed ubiquitously. Other ubiquitous promoters which can be used are RSV (Rous Sarcoma Virus) LTR or the early gene promoter, SV40 (SV40-IE). According to a further embodiment of the invention, in order to modulate the expression of the correctly assembled and functional antibody only in particular districts of the 15 organism, the two transgenes can be brought under the control of two different promoters. In order to express the functional antibody only in a particular district or control the same over time, tissue-specific or inducible promoters can however be used which can be different for the two antibody chains. The preparation of the transgenic animal carried out 20 according to the method of the invention determines the expression of the functional antibody in the adult transgenic animal at levels about 2000 times higher than at birth and this on the one hand, according to the method of the invention, enables the efficiency in the production of viable transgenic brood for both antibody chains to be increased by up to 80 %,

and on the other hand enables the phenotype resulting from the NGF activity only in the adult period to be highlighted, avoiding the neutralisation of NGF during neuronal differentiation.

The transgenic mice obtained according to the method of the invention  
5 express, at different levels and in any case at amounts in the range from 50 to 500 mg/ml of serum, the functional chimeric antibody consisting of both the correctly assembled and secreted chains and said transgenic mice do not develop a lethal phenotype during the first post-natal period, as opposed to the transgenic animal obtained by microinjection of the  
10 plasmids encoding for both the immunoglobulin chains in the same oocyte.

It has furthermore been observed that the muscular apparatus phenotype of the anti-NGF mouse can be reversed by local NGF administration. According to a further aspect, the invention is therefore directed to the use  
15 of NGF for the preparation of pharmaceutical compositions to be used for the therapy of muscular pathologies, such as muscular dystrophy/atrophy. The administration of said neurotrophin can be carried out in different ways, including: intramuscular injection of NGF, for example recombinant, dissolved in suitable physiological solution, or direct injection of plasmid or  
20 recombinant viral vectors, for example adenovirus, or by implant in the muscle of cells genetically engineered for NGF secretion. The dose can depend on various variables such as the specific activity of the protein, severity of the pathology to be treated, the general condition of the patient and in any case can be from 2 to 100 µg/kg of body weight.

25 **Description of the Drawings**

Figure 1: Molecular characterisation of the parent transgenic mice

(A): Transcription units used for the production of the transgenic mouse: light chain (upper panel) and heavy chain (lower panel). CK and CH1-CH3, human constant regions of the light (K) and heavy ( $\gamma$ 1) chains; 5 variable regions of the light (VL) and heavy (VH) chains of the  $\alpha$ D11 monoclonal antibody; Cytomegalovirus pCMV promoter.

(B): Scheme of the crossbreeding carried out to generate the anti-NGF transgenic mouse expressing the anti-NGF functional antibody. VK- $\alpha$ D11 X VH- $\alpha$ D11 (VK: transgenic parent line for the light chain of the  $\alpha$ D11 antibody; VH: transgenic parent line for the heavy chain of the  $\alpha$ D11 antibody. 10

(C): PCR analysis of the VK (upper panel) and VH (lower panel) transgenes. The gel shows the analysis conducted on 12 homozygotic mice cross-bred with non transgenic mice.

(D): Dot blot analysis of four murine lines expressing the light or heavy chain of  $\alpha$ D11 antibody (VK- $\alpha$ D11 or VH- $\alpha$ D11). 15

(E): VH- $\alpha$ D11 (left) and VK- $\alpha$ D11 (right) levels measured in the heart at P1 and P90 days by phosphoimaging analysis normalised for  $\beta$ -actin mRNA (count average +/- SEM).

20 Figure 2: Expression of the functional anti-NGF antibody in neuronal cells

(A): Expression of the VH chain in Purkinje cells from cerebellum of transgenic mouse expressing the heavy chain (C line: negative control).

Value of scale bar = 38  $\mu$ m.

(B): Expression of VK (left) and VH (middle) in DRG (Dorsal Root Ganglia) of family 1 anti-NGF mice (transgenic for both chains). The co-expression of both chains in the same cell is shown in the right panel. Value of scale bar = 75  $\mu$ m.

5 (C): Levels of mouse  $\alpha$ D11 recombinant antibody from 1 and 2 family anti-NGF mice at 1<sup>st</sup> and 90<sup>th</sup> day, as measured in the serum (left) and encephalon (right). The dotted line represents the detection value in the assay (0.1 ng/ml and 0.1 ng/mg, respectively).

10 (D): Control transgenic mouse (transgenic for VH only, below) and 3 family anti-NGF mouse (above), at 17<sup>th</sup> day. The anti-NGF mouse is smaller than the control.

(E): Body weight of anti-NGF (family 1 and family 2) (left) and control mice (right).

Figure 3. Histological and molecular markers of the anti-NGF mouse.

15 A-H.: sections of basal telencephalon; I-L: hippocampus sections.  
A-B: ChAT staining. A. control mice; B: anti-NGF mice.  
C-D: cholinergic innervation towards the frontal cortex. CP: caudate/putamen; FC: frontal cortex; GCC: genus of callosum corpus. C: control mouse; D: anti-NGF mouse.

20 E-F: TrkA staining. E: control mouse; F: anti-NGF mouse.  
G-H: p75 staining. G: control mouse. H: anti-NGF mouse.  
I-L: ChAT staining. I: control mouse; H: anti-NGF mouse.  
M and N sections: Timm staining of hippocampus "mossy fibres". M: control mouse; N: anti-NGF mouse.

**Figure 4: Dilatation of cerebral ventricles**

Coronal sections of mouse encephalon stained according to Nissl method.

The “aged” (15-18 month-old) anti-NGF mice have lateral ventricles (VL) dilated in comparison to the control mice (A). Atrophy of the 5 septohippocampus (SHI) and lateral nuclei (LS) of the septum is observed.

**Figure 5: Atrophy of the cerebral cortex.**

Coronal sections of mouse encephalon obtained at the basal telencephalon level. The frontal cortex in transgenic mice (B) is atrophic in 10 comparison to the control mice (A).

The white bar indicates the cortex thickness measured in the same anatomical point.

**Figure 6. Atrophy of the hippocampus.**

In comparison to those of the transgenic mice (B), the hippocampi of 15 control mice (A) are perfectly formed.

**Figure 7. Neuronal apoptosis**

Labelling of cortical apoptotic neurons obtained according to the TUNEL method.

In the control mice (A) positive cells are not observed, while in the anti- 20 NGF mice (B) various nuclei with DNA fragmentation are observed.

**Figure 8. Phosphorylation of the tau protein**

The transgenic mice show remarkable positivity for the N-terminus segment of the tau protein (B), non phosphorylated tau protein (D) and above all phosphorylated tau protein (F). In the control mice the (A, C, E) 25 labelling is absent. The labelling is localised mainly at the level of the

cerebral cortex (for example in E). The labelling for the N-terminus segment of the tau protein (B) is present in some hippocampus cells (arrows).

Figure 9. Deposition of  $\beta$ -amyloid protein plaques in the encephalon

5 Both the anti-APP MN10 antibody against the  $\beta$ -amyloid precursor protein show the presence of plaques in the *para-cingular* cortex and *neostriatum* in control mice (A) and in higher number and larger size in the anti-NGF transgenic mice (B). In both figures the arrows point to the  $\beta$ -amyloid plaques.

10 Figure 10 Muscular atrophy

Transversal sections of muscles from control mice and anti-NGF mice. Staining: hematoxylin-eosin. M. rectus medialis from the hindlimb of a control mouse (A) and a transgenic mouse (B). M. gastrocnemius of a control mouse (C) and of a transgenic mouse (D). M. tibialis anterioris of a control mouse (E) and of a transgenic mouse (F).

15 Figure 11 Amyloid deposition in the muscle.

Congo red staining shows the presence of amyloid deposition in the muscles of transgenic mice (B) with respect to those of control mice (A).

Figure 12 Amyloid deposition in the muscle.

20 The immunoreactivity against the  $\beta$ -amyloid protein in the muscles of "aged" control mice (A) is completely absent. In the anti-NGF mice (B) a labelling increase, revealed by the brown precipitate, at the level of the sarcolemma and cytoplasm of the myofibres is observed.

Figure 13 Phosphorylation of the tau protein in the muscle

The immunoreactivity against the phosphorylated tau protein in the muscles of "aged" control mice (A) is completely absent. In the anti-NGF mice a labelling increase, revealed by the brown precipitate, at the level of the sarcolemma and cytoplasm of the myofibres (B) is observed.

5      Figure 14 Macrophage infiltration in the muscle.

Longitudinal (A) and cross (B) sections of muscles of "aged" anti-NGF transgenic mice. Among the myofibres the presence of immune type cells, such as macrophages (arrows) is observed.

Figure 15 Position of the nuclei in the myofibres of anti-NGF mice.

10     In some myofibres of "aged" mice the presence of nuclei in the middle of cell (arrows) rather than in the periphery (asterisks) is observed.

Figure 16 Behavioural test for anti-NGF mice

A) Nociceptive test for anti-NGF transgenic and control mice.

B) "Open field" test.

15     C) "Rotarod" test.

D) "Spatial orientation" curves for anti-NGF ( $n = 10$ , filled circles) and control ( $n = 10$ , empty circles) mice in the radial labyrinth test.

The vertical bars represent the standard error. The number of entries needed to find all the four meals is plotted against the time.

20     E) Test of the conservation of the acquired functions, carried out on the 31<sup>st</sup> day after the starting of the learning step.

F) Transfer test of the acquired notions, carried out on the day after the conservation test.

**Example 1 Production of anti-NGF transgenic mice and molecular**

25     **characterisation thereof**

Transgene preparation. Recombinant chimeric antibody was obtained by assembling the sequences of DNA corresponding to the variable murine regions of the Mab  $\alpha$ D11 anti-NGF monoclonal antibody (Ruberti et al., 1993) (Genebank, access numbers: L17077/NID g310168, heavy chain and L17078/g310169, light chain) with the DNA corresponding to the constant regions of the human light K and heavy  $\gamma$ 1 chains. The transcription units corresponding to the chimeric light and heavy chains (figure 1A), containing at 5' the Cytomegalovirus precursor and at 3' the polyadenylation site of the bovine growth hormone (bGH), cloned into the expression vectors pcDNAI-NeoVK $\alpha$ D11HuCK and pcDNAI-NeoVH $\alpha$ D11HuC $\gamma$ , respectively, were extracted using KpnI-Apal and KpnI-XbaI restriction enzymes, respectively, purified and injected separately or in combination in the pro-nucleus of mouse B6SJL strain egg cells fecundated according to standard methods, for example see Allen et al., 1987. Two transgenic parents for the light (A, low producer family, and B family, high producer), two for the heavy (C low producer family and D high producer family) and three for both (double transgenic) antibody chains were obtained. The latter parents, which express the antibody at a level of about 50 ng/ml, are unable to reproduce and therefore are unusable for the continuation of the studies.

The molecular analysis of the transgenic parent mice (A, B, C and D families) was carried out by PCR (Figure 1C) or Dot Blot (Figure 1D) on genomic DNA extracted from tail biopsies as described in Piccioli et al., 1995. Messenger RNA was extracted according to Chomcynski and

Sacchi method, 1987, at different times from birth and was analysed by RNase-protection.

Preparation of the anti-NGF mouse. In order to generate transgenic animals for the functional antibody, consisting of both chains, the two transgenic parents only for the light (parents A and B) or only for the heavy (parents C and D) chains were cross-bred in different combinations (Figure 1B). Only the cross-breeds of A with D and B with C parents, which result in families 1 and 2 of double transgenic heterozygotic mice, respectively, are fertile and generate viable animals with an over 80 % efficiency.

Characterisation of the anti-NGF mouse.

The levels of the functional antibody of either light or heavy chains of the transgenic animals were measured by ELISA assays (Monlar et al., 1998), using a biotin labelled human anti-IgG secondary antibody, after 1:10 dilution of serum or encephalon homogenates (prepared as described in Piccioli et al., 1995) with PBS-2 % powder milk.

The levels of the anti-NGF chimeric antibody for families 1 and 2, measured in the serum and encephalon tissue of adult animals (90 day-old) are higher than 100 ng/ml and 100 ng/mg, respectively. The 2 family values are about two times those of family 1. Immediately after birth (1 day) the antibody levels are on the other hand lower than the detection limit of the assay (0.1 ng/ml in the serum and 0.1 ng/ml in the tissues) (Figure 2C).

The mRNAs specific for the chimeric VH and VK chains are expressed in different tissues among which the encephalon, kidney, heart, muscle, liver

and testicles. The mRNA levels of both chains in the adult (90 day old) are about six times higher than in the newborn animal (1 day) (Figure 1E). Therefore the expression increase (1-2000X) of the anti-NGF functional antibody observed in the anti-NGF heterozygotic animal (double transgenic) is only partially determined by the increase of the mRNA expression levels.

Organ sections of anti-NGF mice are therefore fixed by intracardiac perfusion of 4 % paraformaldehyde in PBS, collected on a slide, preincubated in 10 % foetal serum and 5 % BSA, then used to detect by immunohistochemistry the expression of different antigens: particularly the co-expression of the light and heavy chains of the anti-NGF antibody were made detectable by anti-human light or heavy chain biotinylate (Amhersham), detected by HRP or AP-conjugated avidin-biotin (Elite Standard kits, Vector). The localisation at cerebral level is shown in figure 2A, while in figure 2B it is revealed by immunohistochemistry that the two chains of the chimeric antibody are co-expressed frequently.

#### **Example 2 NGF phenotype knockout in anti-NGF transgenic mouse**

The characterisation of the anti-NGF mouse phenotype was carried out at different levels: macroscopic, histological and molecular.

At macroscopic level, during the first 3-4 life weeks the anti-NGF transgenic mice do not show remarkable abnormalities, except for an about 25 % decrease of body weight compared to corresponding control mice (Figure 2 D and E).

Usually the experiments were carried out on anti-NGF transgenic animal of numerosity group n = 6 with anti-NGF antibody levels from 50 to 300

ng/ml; as controls transgenic mice after birth only for the antibody heavy chain (VH) (parent C or D), therefore not expressing the functional antibody.

At the histological and molecular level, the following differences, 5 compared to normal mice, were observed, district by district: 1) central and peripheral nervous systems, 2) muscular apparatus and 3) spleen.

**1) Central and peripheral nervous systems**

In the basal telencephalon an up to 57 % reduction in the number of acetyltransferase-positive neurons and a reduction of the expression level 10 were observed, while in the hippocampus an up to 70 % reduction of neurons is observable. In addition the cells appear morphologically smaller. As for the peripheral nervous system the upper cervical ganglia are up to 45 % smaller than control; also in this case the constituting cells appear morphologically smaller (Figure 3 A-B).

15 The morphological and histological aspect of the mouse encephalon expressing the anti-NGF recombinant antibody was analysed in transgenic 15-18 month-old mice ("aged" animals) in combination with the presence of phenotypic labels of neurodegenerative diseases such as: "neuronal loss" and apoptosis, synthesis of choline-acetyltransferase (ChAT) (Figure 20 3 A, B), determined by immunohistochemistry with anti-ChAT anti-serum (Chemicon), ratio of phosphorylated to non phosphorylated tau protein (measured by immunohistochemistry with specific antisera), presence of  $\beta$ -amyloid protein and precursor of phosphorylated amyloid protein, APP (Amyloid Precursor Protein) (determined by immunohistochemistry with 25 specific antisera). The numerosity of the groups used for the experiments,

except where otherwise indicated, was n = 6 transgenic anti-NGF with transgenic anti-NGF antibody levels from 50 to 300 ng/ml; as control mice after birth that were transgenic only for the antibody heavy chain (VH) (parents C and D), therefore not expressing the functional antibody.

5 The obtained results can be summarised in the following points:

(a) Dilatation of the cerebral ventricles (Figure 4). The severity of the ventricular dilatation is associated with a remarkable atrophy of the cerebral cortex (Figure 5) and hippocampus (Figure 6).

10 (b) Neurodegeneration and neuronal loss. It is possible to visualise apoptotic cells in more severely damaged mice at cerebral level as highlighted by TUNEL method (Figure 7). Apoptotic phenomena indicate progressive cell death.

15 (c) Decrease of the choline-acetyltransferase (ChAT) synthesis (Figure 3 A-B and I-L), particularly in the basal telencephalon. In particular, no neurons positive for this label in the nucleus of the medial septum are observed in analysed animals. The expression, in comparison to that observed in younger (2-3 month-old) transgenic mice, is decreased. A lower expression is also observed for the two NGF-receptors, TrkA (Figure 3 E-F) and p75, in the basal telencephalon (Figure 3 G-H). Particularly the 20 decrease for the TrkA-positive cells is more remarkable than for p75-cells.

(d) Increase of the tau protein phosphorylation (Figure 8). Using specific antibodies against the tau protein N-terminus segment [Alz-50 (Wolozin et al., 1986)] (Figure 8A and 8B), against the non-phosphorylated tau protein [anti-Tau 1 (Grundke-Ippolito et al., 1986)] (Figure 8C and 8D) and against 25 the same epitope of the phosphorylated tau protein [mAB AT-8

(Greenberg and Davies, 1990)] (Figure 8E and 8F), by immunohistochemistry a remarkable generalised increase of the tau synthesis, mainly of the phosphorylated component thereof, was detected. The used antibodies label cortical neurons which have a modified morphology, revealing the presence of neuropil threads, ghosts and tangles. The labelling against the phosphorylated form of tau protein has shown a remarkable increase of this protein also in the microglia cells which are activated in neurodegenerative processes. Antibodies against the  $\beta$ -amyloid protein and amyloid precursor protein [APP (Glenner and Wong, 1984)] show the presence of several plaques in both the *paracingular cortex* and *neostriatum* (Figure 9A and 9B).

In conclusion, the transgenic mice expressing the anti-NGF antibody display at the level of the central and peripheral nervous system many pathological modifications that are typical of neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer's disease.

## 2) Muscular apparatus

The mice evaluated ( $n = 15$ ), from 45 to 60 days after birth, at a macroscopic level stagger, due to an abnormal position of the rear legs and support of toe tips and often present scoliosis of the vertebral column. The anatomical analysis shows a reduction of the back longitudinal skeletal muscles, flexors and adductors of the rear limbs, which characteristic is not observable in other muscles, for example in the corresponding muscles of the front limbs.

Some deficits were better characterised and are disclosed in detail in the following points:

a) muscular dystrophy, characterised from the morphological and histological point of view. Atrophy of the muscular fibres is present, in all the analysed animals ( $n = 15$ ), at the level of the muscles which allow the movements of the vertebral column and aid the stability of the connections between vertebrae (longest muscle for the vertebral column and intervertebral muscles, respectively). Further in all the animals the reduction of the diameter of the muscular fibres (up to 50 %) is observable in 70 % of the fibres: in the adductor muscles (leg medial rectus, large and small adductor), leg flexor (outer, medial and inner ischiotibials) and metatarsus extensors (gastrocnemius and soleus muscles). On the contrary the atrophy is not present at the level of the metatarsus flexor muscles (front tibial and phalanx extensor muscles) and it is less evident in the front limb extensor muscles (brachial triceps muscle). All these differences are shown in Figure 10. Further, every dystrophic muscular fibre shows also a remarkable vacuolization (Figure 10B-E) and more intense staining by haematoxylin/eosine.

b) scoliosis, in some animals ( $n < 6$ ), in some cases associated with an incomplete development of the vertebral bodies.

c) muscular atrophy, typified at molecular level as follows:

c.1) re-expression of the low affinity NGF receptor (p75). It is particularly clear in some muscular cells exhibiting modifications in the distribution of nicotine receptors at the level of the neuromuscular junctions.

c.2) decrease in the number of the nervous peptidergic endings at the level of the neuromuscular junctions. This decrease was detected by

antibodies against the calcitonin gene-related peptide [CGRP (Gibson et al., 1984)].

c.3) absence of the aggregation of the acetylcholine receptors in the plasmatic membrane of the muscular cells and detected by the irreversible binding of alpha-bungarotoxin (Changeux, 1991), caused by the failed innervation of the muscular fibre. The distribution of the muscular cells exhibiting such a modification gives the muscles of the transgenic mice a characteristic mosaic pattern.

c.4) increase of the dystrophin immunoreactivity detectable in the above described cells exhibiting molecular modifications described above by immunohistochemistry using D-8043 antibody (Sigma). The dystrophin is a protein of the cytoskeleton of the muscular cell involved in the contraction and aggregation of the cholinergic receptors. It is already known that an increase in the dystrophin synthesis occurs concurrently with the muscle denervation.

c.5) ATPase altered metabolism due to the lack of the nerve trophic effect.

c.6) remarkable deposition of amyloid substance, detected by a characteristic ring cytoplasmic staining by Congo Red (Figure 11A-B). The presence of amyloid and particularly  $\beta$ -amyloid was detected also by immunohistochemistry against the  $\beta$ -amyloid precursor protein (Figure 25A-B) in aged mice.

c.7) phosphorylated tau protein in the muscles of the aged mice (aged from 15 to 18 months). Figure 13A-B.

c.8) presence of various muscular fibres with nuclei located in the middle rather than below the sarcolemma in "aged" anti-NGF mice (Figure 15). Histological assays detect an infiltration of immune type cells, probably macrophages, among the muscular fibres (Figure 14A-B).

5 The presence of deposits of the  $\beta$ -amyloid and hyperphosphorylated tau protein and in addition nuclei located in the middle region and macrophages infiltration is related to what is observed in inclusion body myositis (IBM), a pathology strictly correlated to Alzheimer's disease.

### 3) Spleen

10 At the anatomical level the localisation of the sympathetic innervation is distributed in the germinal centre and marginal zone, rather than in the proximity of the central artery, as in the control mice. The recovery of the viable splenocytes is reduced by one order of magnitude ( $2-3 \times 10^6$  vs.  $2-3 \times 10^7$  of the controls) in the anti-NGF transgenic mice, as observed by flow cytometry. Functionally, a reduction of the number of the IgG positive lymphocytes and a fair increase of the IgD positive lymphocytes can be observed, as measured after incubation (30', 4°C) of the splenocytes with FITC anti-IgG (Sigma), IgM, IgA, IgD mouse (Pharmingen) labelled primary antibodies and analysis by Coulter Epics Elite Esp Flow Cytometer at 488 nm.

15

20 Furthermore, in the red pulp DNA fragmentation can be detected indicating apoptosis reflecting the reduced recovery of viable splenocytes.

### **Example 3 Analysis of the behaviour of the anti-NGF transgenic mice**

25 The analysis was carried out on 12-18 month old animals ( $n = 6$ ), selecting animals without evident gait anomalies.

The following anomalies, summarised in Figure 16, with respect to the control animals were detected:

- increase of the latency time for the heat sensitivity, changed from 3" for the control mice to 16" for the anti-NGF mice, as measured according to 5 the hot plate nociceptive assay, already described in Eddy et al., 1953;
- spatial orientation: the anti-NGF mice exhibit a higher number of errors during working memory learning over the first three days, in fact the learning curves are significantly different (two way RMANOVA test,  $p<0.05$ ), however the final learning level is not different from that of the 10 control mice, as measured by the radial labyrinth test, carried out as follows: the animals were placed in an 8-arm radial labyrinth and were left free to feed themselves for 5' and familiarise themselves with the labyrinth over two days (pre-training). For the test the same four arms were filled with food every day: at the beginning of each test the mice were left at the 15 centre of the labyrinth, free to explore it: the test was terminated if the food was finished or 25 entries were observed into the arms of the labyrinth: the tests were repeated twice a day over 14 days, mistakes made (short and long term memory mistakes) and time taken being measured. The starting and final learning levels were evaluated using the 20 average of the mistakes made over the first and last three days.
- ability to maintain the acquired notions. The anti-NGF mice do not maintain the acquired notions at 31<sup>st</sup> day from the learning step, as measured by the same radial labyrinth test. The learning curves were compared with the two way ANOVA test (treatment x time) and the 25 significance of the differences evaluated by T-test.

- deficit in the ability to transfer learning to another situation, as measured by the radial labyrinth test, using food filled exits different from those used in the learning step. The anti-NGF mice exhibit a clear learning deficit ( $p < 0.01$  in two-way RMANOVA test) in comparison to the control mice, also after 5 days of learning. The differences resulted mainly from a higher number of short-term memory errors (T-test,  $p < 0.006$ ).

**Example 4 Reversibility of muscular dystrophy in anti-NGF mice by Local NGF administration**

All the experiments were carried out on 45-day old mice, when the serum 10 level of the anti-NGF antibody is about to reach the highest level (observed 60 days after birth).

The NGF was administered locally by different methods: (a) by intramuscular injection of NGF (b) by a viral recombinant vector (adenovirus) encoding for NGF cDNA or (c) by the implant of NGF 15 secreting fibroblasts. All the administration paths included injection or implant into the gastrocnemius muscle, one of the skeletal muscles affected by muscular dystrophy. The injections and implants were carried out on the right leg, while the gastrocnemius muscle of the left leg was used as control. A) NGF was injected in pellet form, consisting of NGF 20 mixed with diazocellulose in borate buffer at pH 8.0 for 72 hours and following neutralisation by glycine saturated solution (Hendry, 1982). This method allows the exact localisation and slow release of this neurotrophin. Different NGF concentrations were used, comprised in the range from 100  $\mu\text{m}$  and 2 mg for each animal. For the administration of cDNA according to

method b), 10  $\mu$ l of the adenoviral vector solution corresponding to  $10^7$  pfu/ml were injected into the gastrocnemius muscle. In the control animals a recombinant adenovirus containing Escherichia coli Lac Z reporter gene was injected. Both in this and in fibroblast injection experiment (see later) 5 the NGF production was constant at least over one month, allowing phenotype reversibility to be observed.

According to method c) were implanted in the muscle, fibroblasts genetically modified to secrete NGF by infection with a retroviral vector encoding for cDNA of this neurotrophin, according to the method 10 described by Gage et al. (1990). This allowed an in situ NGF production to be obtained that was equal to 100 ng/ $10^6$  cells/day. The fibroblasts were injected after re-suspension in sterile physiological solution at  $2 \times 10^5$  cells/ $\mu$ l concentration. The injection volume was 10  $\mu$ l/animal.

To verify the effect of the NGF administration, the animals were sacrificed 15 7, 15 and 30 days after the injection. The injected and contralateral muscles were collected and analysed by histological and immunohistochemical techniques to verify the attenuation of the dystrophy and the restoration of usual innervation. Thus it was verified that in all the injected animals the values of the muscular fibre diameter were again 20 similar to those of the control animals. Furthermore, their morphology and cholinergic and peptidergic innervation regained a usual appearance.

With regard to the restoration of the cholinergic phenotype in the basal telencephalon, two different approaches were used. In a first set of experiments after the anaesthesia the equipment of NGF releasing

minipumps was used. A rubber capillary tube was inserted in the lateral ventricle and then connected by means of an osmotic minipump to a "pocket" of the subcutaneous layer. This pump was filled by NGF (30 – 100 µg) diluted with Ringer-Locke physiological solution. Another group of 5 animals was treated by an implant of fibroblasts genetically modified to secrete NGF. The fibroblasts were injected in the lateral ventricle at  $2 \times 10^5$  cells/µl concentration. The injection volume was 1.5 µl/animal. This second method allowed E.L.I.S.A. to be used to verify the constancy of 10 NGF production over 4 weeks after implantation. The analysis of the cholineacetyl transferase expression (ChAT) in the nuclei of the basal telencephalon and the analysis of the behaviour of these mice allowed phenotype reversibility to be observed in the anti-NGF mice at the level of 15 the cholinergic system.

Overall, these results confirm that NGF administration is able to correct the muscular and cholinergic deficit observed in the anti-NGF mice.

## BIBLIOGRAPHY

Allen, ND, Barton, S.C., Surani M.A. and Reik W. (1987) production of transgenic mice. In *Mammalian development: A practical approach*, M. Monk, ed. (Washington DC: IRL Press) pp 217-234.

5 Baron P., Scarpini E., Meola G. Santilli I., Conti G., Pleasure D., Scarlato G. (1994) Expression of the low-affinity NGF receptor during human muscle development, regeneration, and in tissue culture. *Muscle and Nerve* 17: 276-284.

Boissiere F., Faucheu B., Ruberg M., Agid Y., Hirsch E.C. (1997)

10 10 Decreased TrkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 145: 245-252.

Borchelt D.R. Ratovitski T., van Lare J., Lee M.K., Gonzales V., Jenkins N.A., Copeland N.G., Price D.L., Sisodia S.S. (1997). Accelerated amyloid

15 15 deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19:939-945.

Brion JP, Tremp G., Octave JN (1999). Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J*

20 20 *Pathol* 154:255-270.

Changeux JP, Duclert A., Sekine S. (1992) Calcitonin gene-related peptides and neuromuscular interactions. *NY Acad Sci* 657:361-378.

Chomcynski P., and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

25 25 *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G., Johnson-Wood K., Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R., Sherrington R., Perry B., Yao H., Strome R., Lieberburg I., Rommens J., Kim S., Schenk D., Fraser P., St George Hyslop P., Selkoe D.J. (1997).

5      Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3:6772.

Connor B., Dragunow M. (1998) The role of neuronal growth factor in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 27:1-39.

10     Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C., Chen K.S., Pitts-Meek S., Armanini M.P., Lanway H.L., McMahon, Shelton D.L., Levinson A.D.S.B., and Phillips H.S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop BF cholinergic neurons. *Cell* 76:1001-1011.

15     Davies A.M. (1992). Cell death and the trophic requirements of developing sensory neurons. In *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*, S. Scott, ed. (Oxford. Oxford University Press), pp 194-214.

Eddy N.B. and Leimbach D. (1953), Synthetic analgesic (II): dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107: 20     385-396.

Eide F., Lowenstein D.H. and Reichardt L.F. (1993). Neurotrophins and their receptor-current concepts and implications for neurologic disease. *Exp. Neurol.* 121: 200-214.

Fukuchi K., Pham D., Hart M., Li L., Lindsey J.R. (1998) Amyloid-beta deposition in skeletal muscle of transgenic mice: possible model of inclusion body myopathy. *Am. J. Pathol.* 153: 1687-1693.

Gage F.H., Rosenberg M.B., Tuszyński M.H., Yoshioka K., Armstrong D.M.,  
5 Hayes R.C., and Friedmann T. (1990). Gene therapy in the CNS: intracerebral grafting of genetically modified cells. *Prog Brain Res.* 86: 205-217

Games D, Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Berthelette P., Blackwell C., Carr T., Clemens J., Donaldson T., Gillespie F., et al. (1995).  
10 Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.

Gibson S.J., Polak J.M., Bloom S.R., Sebaté I.M., Mulderry P.M., Ghatei M.A., McGregor G.P., Morrison J.F.B., Kelly J.S., Evans R.M., Rosenfeld M.G. (1984) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in  
15 the spinal cord of man and of eight species. *J. Neurosci.* 4: 3101-3111.

Glenner G.C., Wong C.W. (1984) Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 120: 885-890.

Goedert M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of  
20 Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16: 460-465.

Gotz J., Probst A., Spillantini M.G., Schafer T., Jakes R., Burki K.,  
Goedert M. (1995). Somatodendritic localisation and  
hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the  
longest human brain tau isoform. *EMBO J.* 14:1304-1313.

Greenberg S.G., Davies P., (1990) A preparation of Alzheimer-paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5827-5831.

Grundke-Iqbali I., Iqbali K., Tung Y.C., Quinlan M., Wisniewski H.M., Binder 5 Li (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4913-4917.

Holcomb L., Gordon M.N., McGowan E., Yu X., Benkovic S., Jantzen P., Wright K., Saad I., Mueller R., Morgan D., Sanders S., Zehr C., O'Campo 10 K., Hardy J., Prada C.M., Eckman C., Younkin S., Hsiao K., Duff K. (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.* 4:97-100.

Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., 15 Yang F., Cole G. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.

Irizarry MC, Soriano F., McNamara M., Page K.J., Schenk D., Games D., Hyman B.T. (1997b). A beta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor 20 protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J. Neurosci.* 17:7053-7059.

Jin L.W., Hearn M.G., Ogburn C.E., Dang N., Nochlin D., Ladiges W.C., Martin G.M. (1998). Transgenic mice overexpressing the C-99 fragment of betaPP with an alpha-secretase site mutation develop a myopathy similar to human inclusion body myositis. *Am. J. Pathol.* 153:1679-1686.

Kalaria R.N. (1993) The immunopathology of Alzheimer's disease and some related disorders. *Brain Pathol* 3:333-347.

Levi-Montalcini R., and Brooker B., (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a Nerve Growth Factor Protein.

5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:384-391.

Luxenberg J.S., Haxby J.V., Creasey H., Sundaram M., Rapoport SI. (1987). Rate of ventricular enlargement in dementia of the Alzheimer type correlates with rate of neuropsychological deterioration. *Neurology* 37:1135-1140.

10 Mandelkow E.M., Mandelkow E., (1993) Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem. Sci.* 18:480-483.

Mizutani T, Amano N, Sasaki H, Morimatsu Y, Mori H, Yoshimura M., Yamanouchi H., Hayakawa K., Shimada H., (1990) Senile dementia of Alzheimer type characterized by laminar neuronal loss exclusively in the

15 hippocampus, parahippocampus and medial occipitotemporal cortex. *Acta Neuropathol. (Berl)* 80:575-580.

Molnar, M., Tongiorgi E., Avignone E., Gonfiori S., Ruberti F., Domenici L., and Cattaneo A., (1998). The effects of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies on developing BF neurons are transient and reversible. *Eur. J. Neurosci.* 10: 3127-3140.

20 Piccioli P., Di Luzio A., Amann R., Schuligoi R., Azim Surani M., Donnerer J., and Cattaneo A. (1995). Neuroantibodies: ectopic expression of a recombinant anti-substance P antibody in the central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 15: 373-384.

Ruberti F., Bradbury A. and Cattaneo A. (1993). Cloning and expression of an anti-nerve growth factor (NGF) antibody for studies using the neuroantibody approach. *Cell. Mol. Neurobiol.* 13: 559-568.

Schnell L., Schneider R., Kolbeck R., Barde Y. A., Schwab M.E. (1994).

5 Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during the development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367: 170-173.

Selkoe D.J. (1994). Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 708-716.

Snider W.D. and Johnson E.M. Jr. (1989). Neurotrophic molecules. *Ann. Neurol.* 26: 489-506.

10 Sturchler-Pierrat C., Abramowski D., Duke M., Wiederhold K. H., Mistl C., Rothacher S., Ledermann B., Burki K., Frey P., Paganetti P.A., Waridel C., Calhoun M.E., Jucker M., Probst A., Staufenbiel M., Sommer B., (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with 15 Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 13287-13292.

Wolozin B.L., Pruchnicki A., Dickson D.W., Davies P. (1986) A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science* 232:648-650.

20 Wong TP, Debeir T., Duff K., Cuello A. C. (1999). Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenillin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J. Neurosci.* 19: 2706-2716.

## CLAIMS

1. Non-human, transgenic, mammalian animal for an anti-NGF (NGF: Nerve Growth Factor) antibody.
2. Animal according to claim 1, wherein the anti-NGF antibody blocks the NGF binding to the receptors thereof.
3. Animal according to claim 1, that expresses the anti-NGF antibody only in adulthood.
4. Transgenic animal according to claim 3, that expresses the anti-NGF antibody in serum at measurable levels from 50 to 500 ng/ml.
- 10 5. Animal according to claim 1, wherein the anti-NGF antibody is the monoclonal  $\alpha$ D11.
6. Animal according to claim 5, wherein the  $\alpha$ D11 antibody is chimeric.
7. Animal according to claim 6, wherein the chimeric antibody is humanised.
- 15 8. Animal according to claim 1, belonging to murine genus.
9. Animal according to claim 8, belonging to BS6JL strain.
10. Transgenic animal according to claim 1, expressing at least one of the pathologies included in the following group:
  - neurodegenerative syndromes
  - 20 - muscular atrophy/dystrophy
  - modification of the lymphocytic subpopulations and cellular death in the spleen.
11. Transgenic animal according to claim 10, wherein the neurodegenerative syndrome exhibits at least one of the anatomical,

histological, molecular or phenotypic markers included in the following group:

- dilatation of the cerebral ventricles,
- atrophy of the cerebral cortex and/or complete disappearance of the
- 5 hippocampus;
- neuronal loss and/or apoptosis,
- deposition in CNS of plaques of  $\beta$ amyloid protein,
- cognitive deficits characterised by loss of long/short-term memory,
- hyperphosphorylation of the tau protein,
- 10 - neurofibrillar pathology.

12. Animal according to claim 11, wherein at least one of the anatomical or histological markers included in the following group:

- dilatation of the cerebral ventricles
- atrophy of the cerebral cortex
- 15 - neuronal loss

are present at a level higher than that of the animals used as control.

13. Transgenic animal according to claim 10, wherein the muscular atrophy/dystrophy is associated at muscular level with at least one of the anatomical, histological, molecular or phenotypic markers included in the

20 following group:

- deposition of plaques of  $\beta$ amyloid protein,
- hyperphosphorylation of the tau protein,
- infiltration of inflammatory cells.

14. Cells deriving from the transgenic animal according to claim 1.

15. Use of the cells according to claim 14 for the selection of molecules that are active in neurodegenerative pathologies.
16. Use of the cells according to claim 14 for the selection of molecules that are active in muscular pathologies.
- 5 17. Method for the preparation of a non-human transgenic animal according to claim 1 that comprises essentially the steps of:
  - a) preparation of a non-human animal transgenic parent line for the light chain of the monoclonal anti-NGF antibody and of a non-human animal transgenic parent line for the heavy chain of the anti-NGF antibody,
  - 10 b) crossbreeding of the two transgenic parent animal lines
  - c) selection of the brood.
18. Method according to claim 17 wherein the step a) essentially comprises the introduction of the transcription unit containing the encoding transgene for the light chain of the anti-NGF antibody and the transcription unit containing the encoding transgene for the heavy chain of the anti-NGF antibody, separately, in different fecundated oocytes and the selection of transgenic parents for either of the transgenes.
- 15 19. Use of the transgenic animal according to claim 1 as a model for the study of the pathologies related to an NGF deficit.
- 20 20. Use of the transgenic animal according to claim 19 wherein such a deficit results from the presence of anti-NGF autoantibodies.
21. Use of the transgenic animal according to claim 1 as a model for the study of neurodegenerative syndromes.
22. Use of the transgenic animal according to claim 21 wherein the neurodegenerative syndrome is Alzheimer's disease.

23. Use of the transgenic animal according to claim 1 as a model for the study of the pathologies of the muscular apparatus.

24. Use of the transgenic animal according to claim 1 for the selection of compounds effective in the treatment of pathologies included in the

5 following group:

- neurodegenerative syndromes
- muscular atrophy/dystrophy.

25. Use of the transgenic animal according to claim 24 wherein the neurodegenerative syndrome is Alzheimer's disease.

10 26. Use of NGF (Nerve Growth Factor) or peptide fragments thereof for the preparation of pharmaceutical compositions for the treatment of muscular pathologies.

27. Use of NGF according to claim 26 wherein NGF is provided as one of the following forms:

15 - natural NGF

- recombinant NGF
- synthetic NGF
- NGF secreted by implant of genetically engineered cells
- NGF encoded by viral vectors.

20 28. Use of NGF according to claim 27 wherein said treatment is provided by local administration.

29. Pharmaceutical compositions including NGF (Nerve Growth Factor) for the treatment of muscular pathologies.

Milan, 6 August 1999

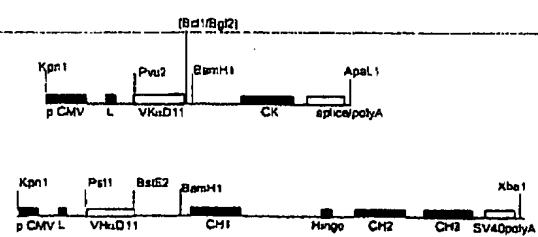
25 For S.I.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

The patent attorney

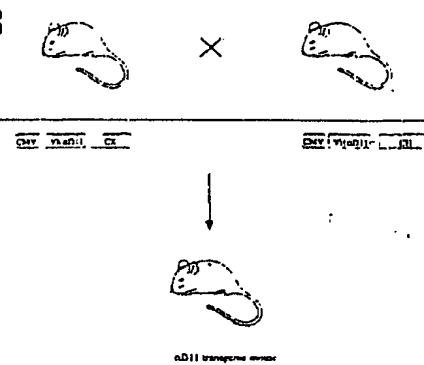
Dr Diego Pallini

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

**A**



**B**



**C**

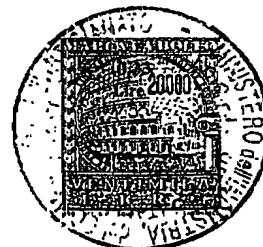
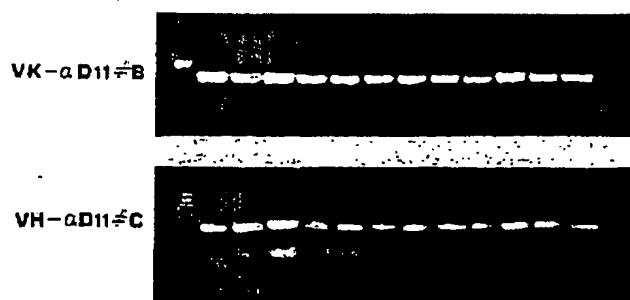


FIG. 1

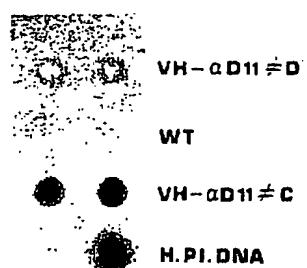
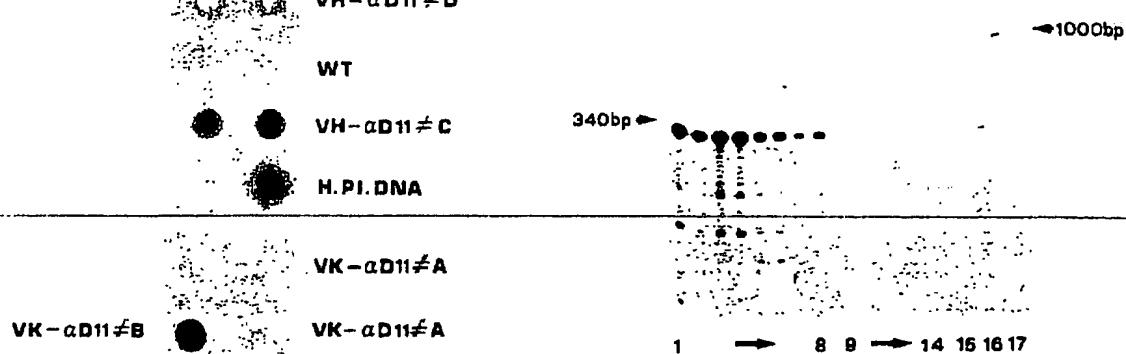
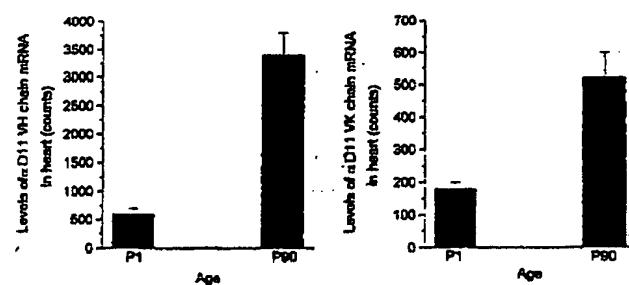
**D****E****F**

FIG. 1 CONT

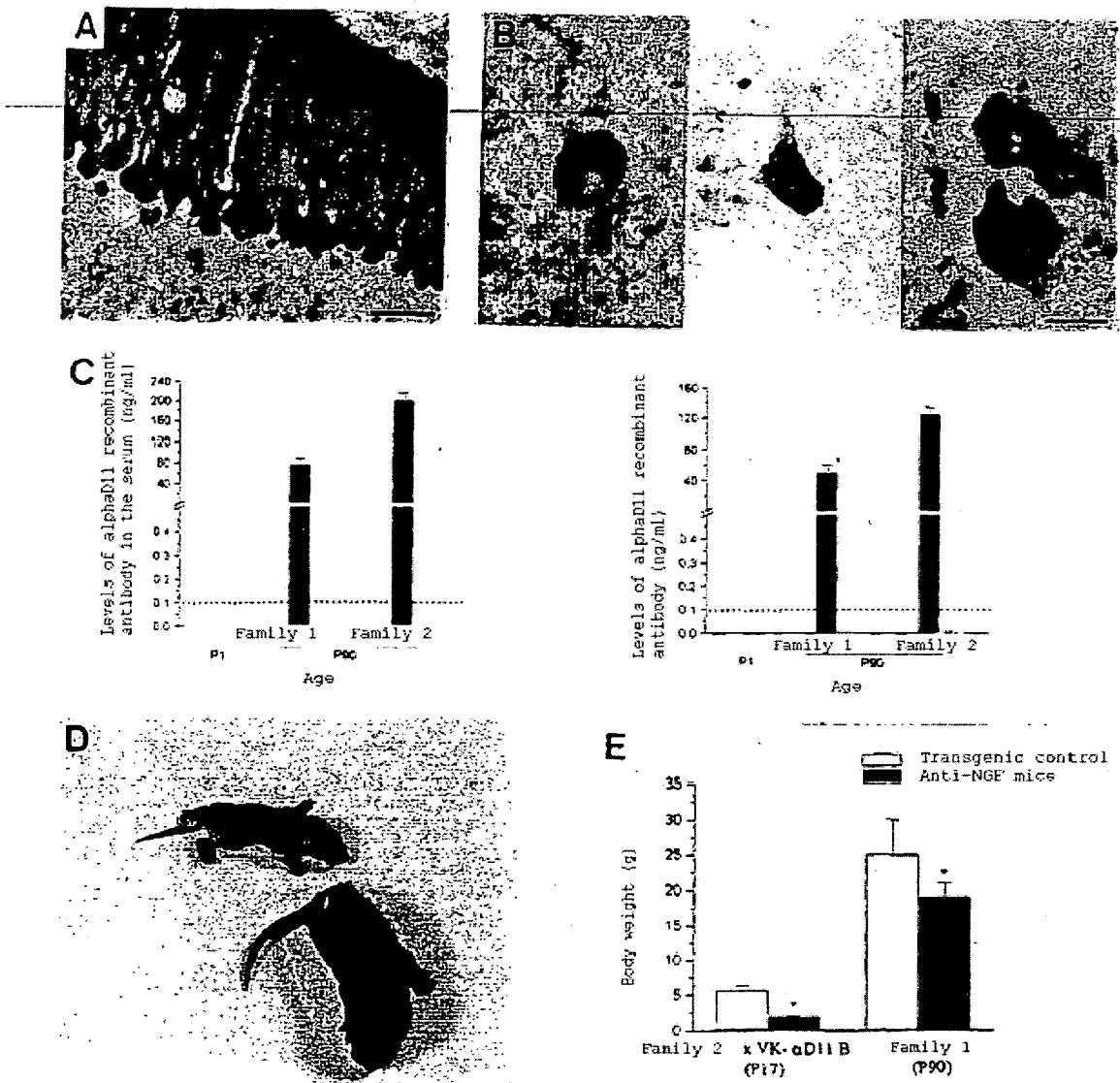


FIG. 2

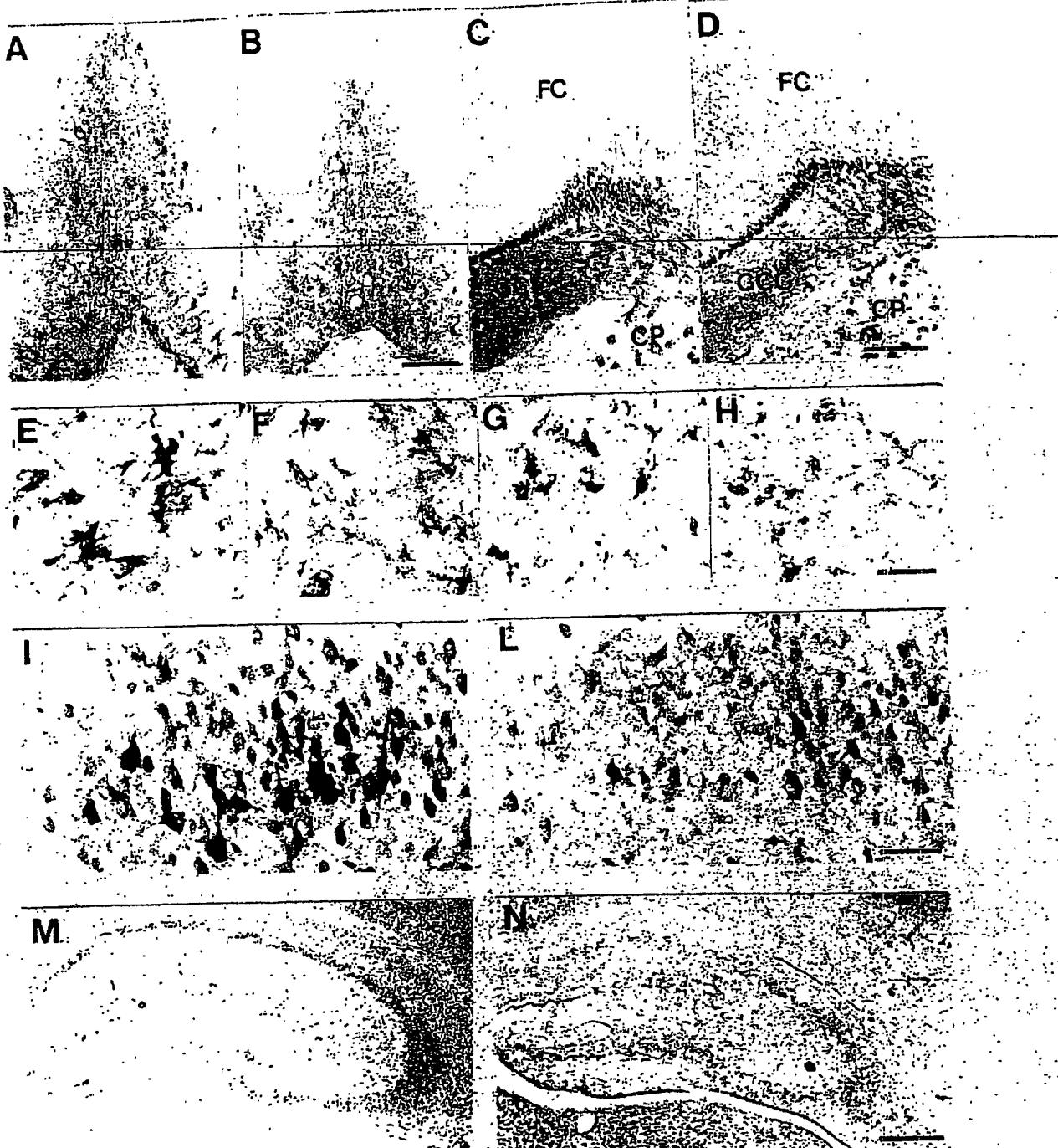


FIG. 3

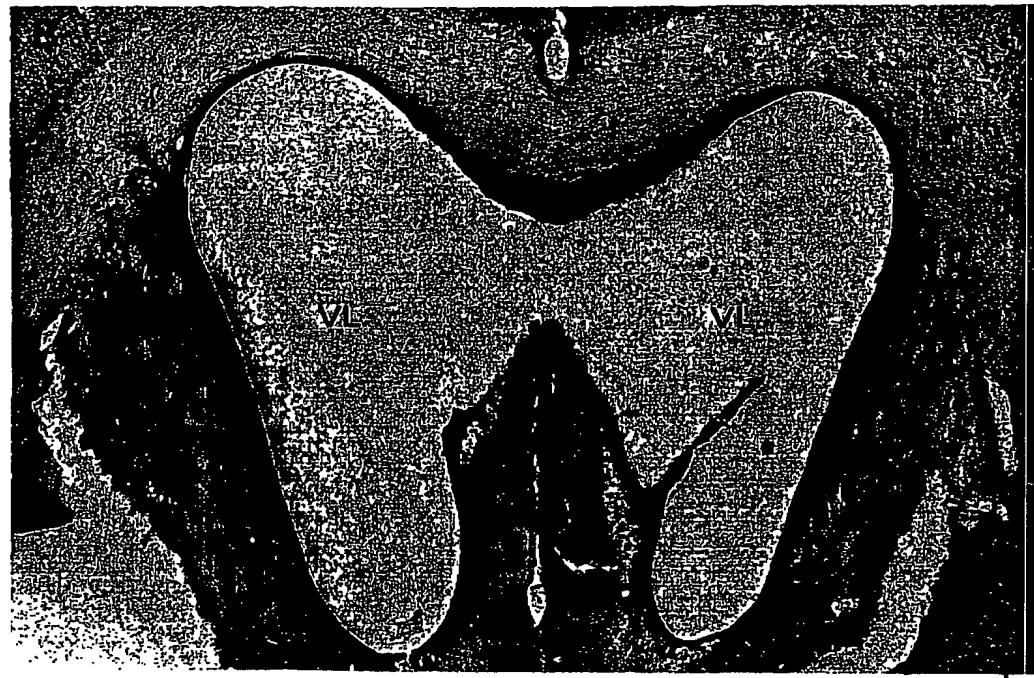
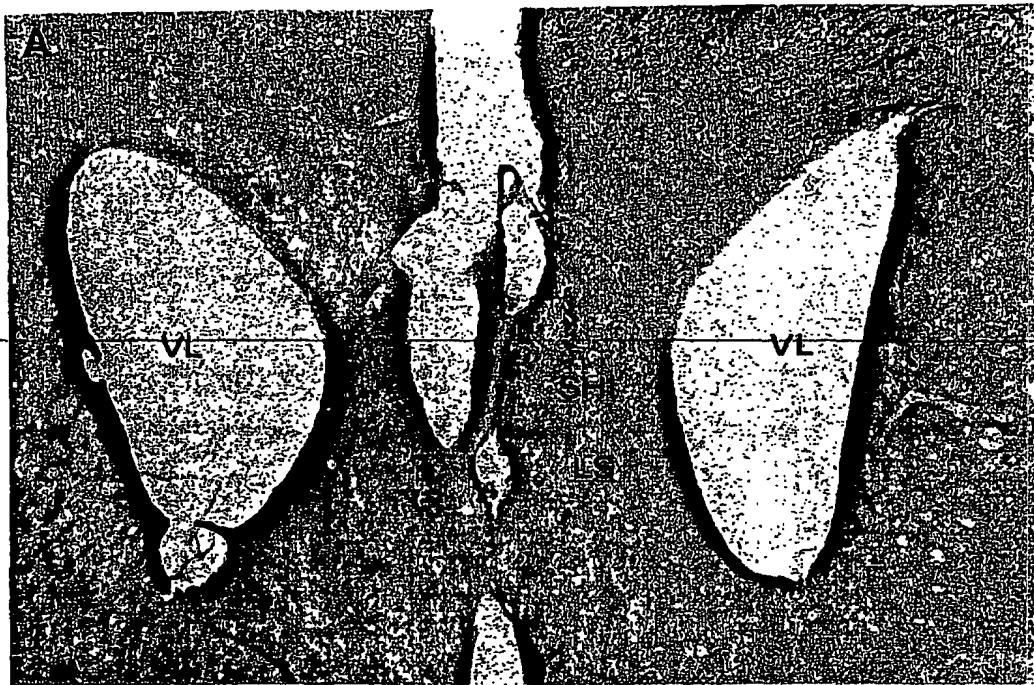
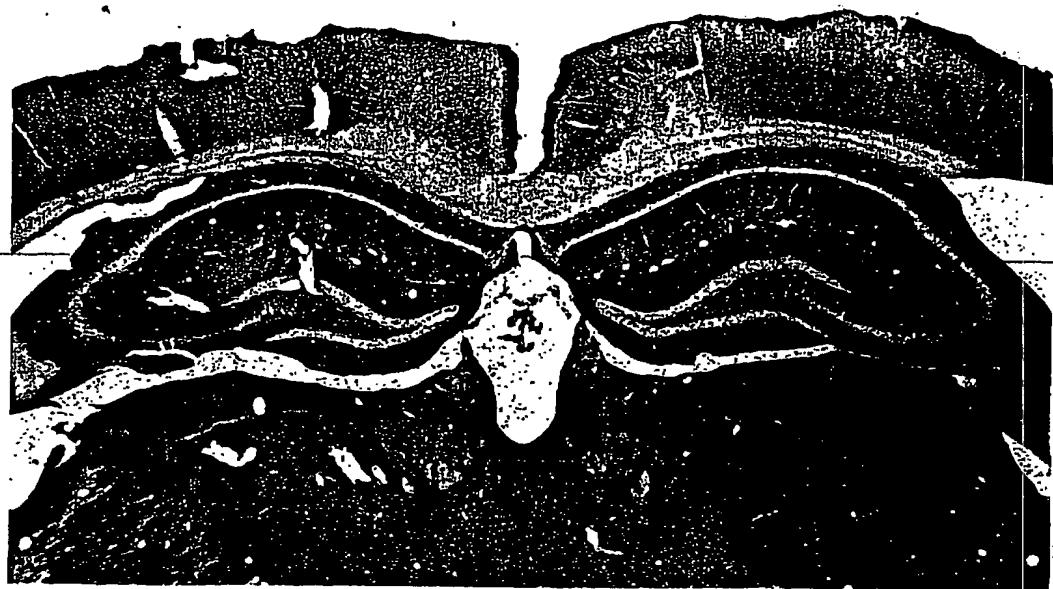


FIG. 4

A



B

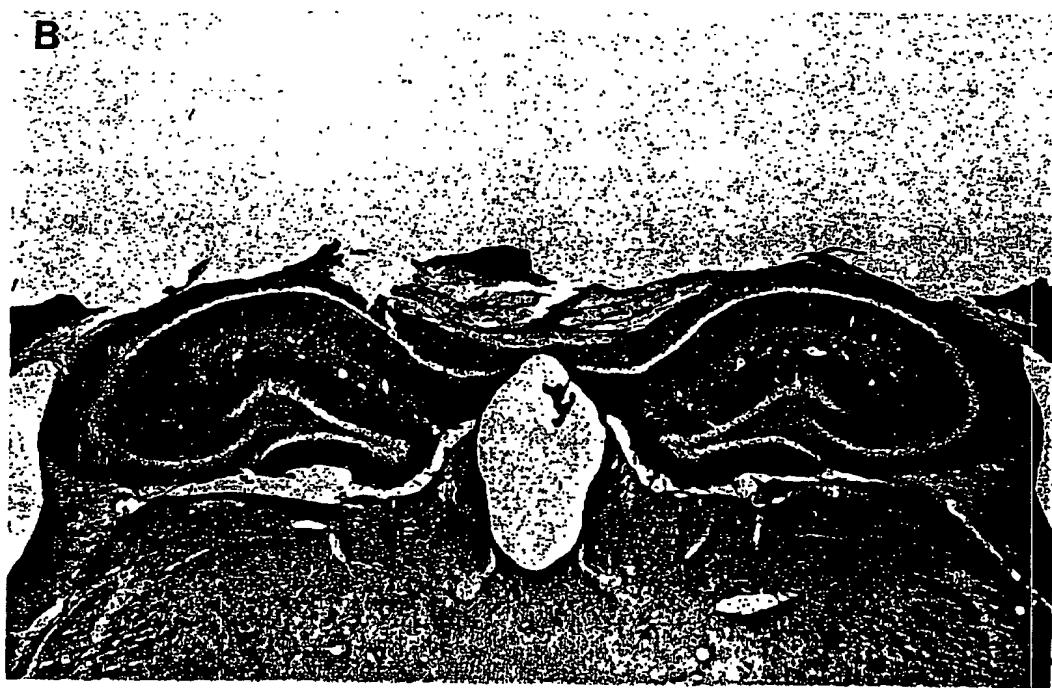
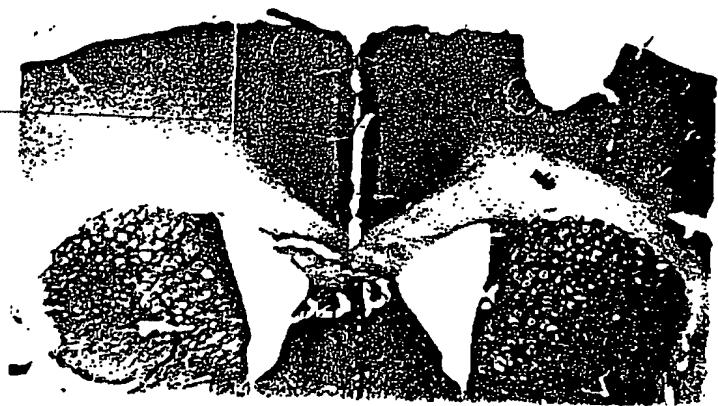


FIG. 5

A



B

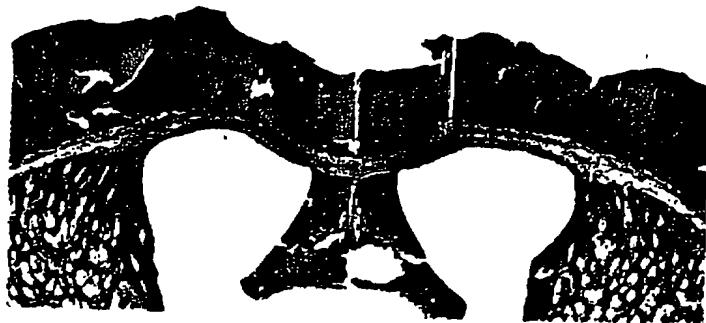


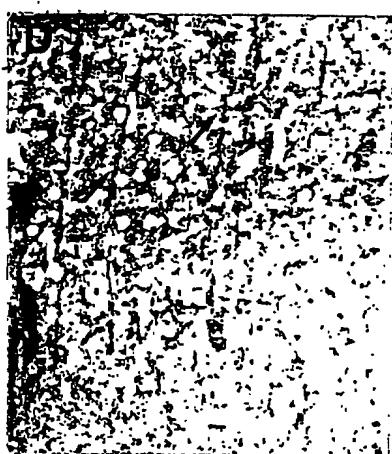
FIG. 6

A

B

FIG. 7

A



E

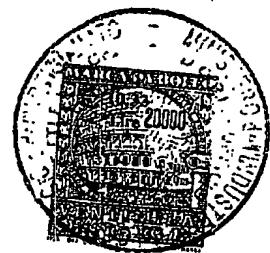


FIG. 8

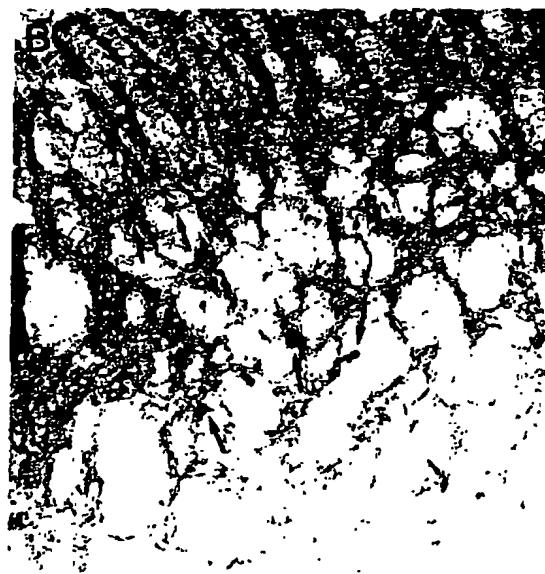
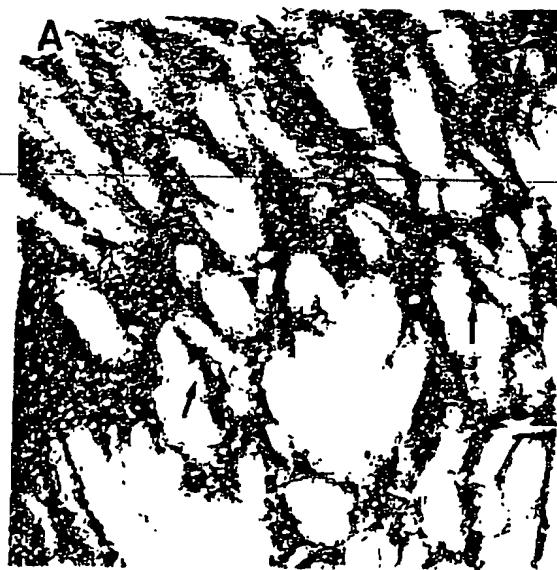


FIG. 9

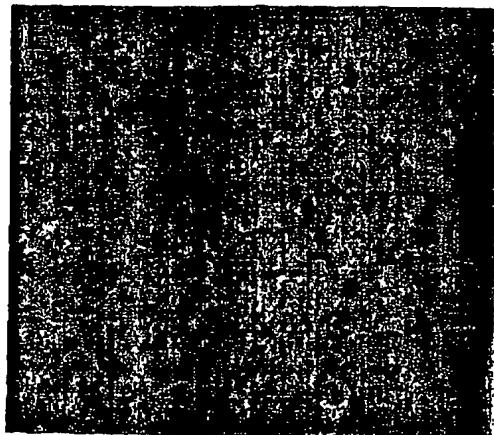
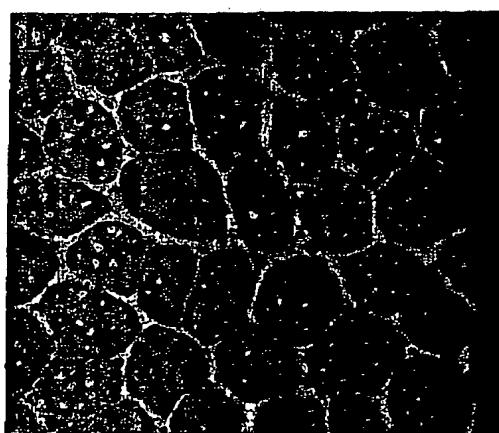
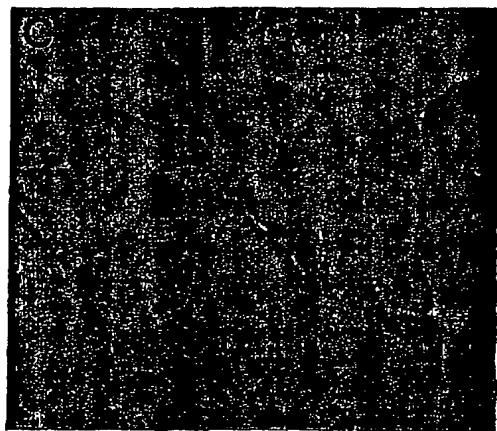
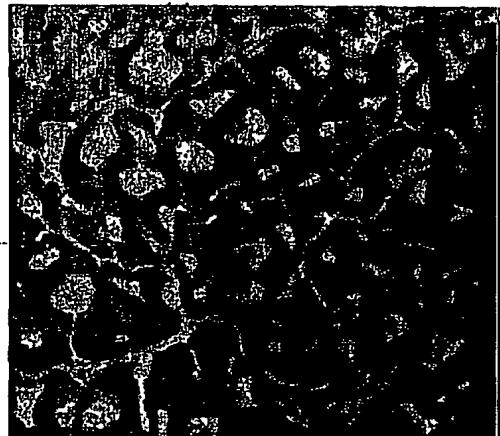
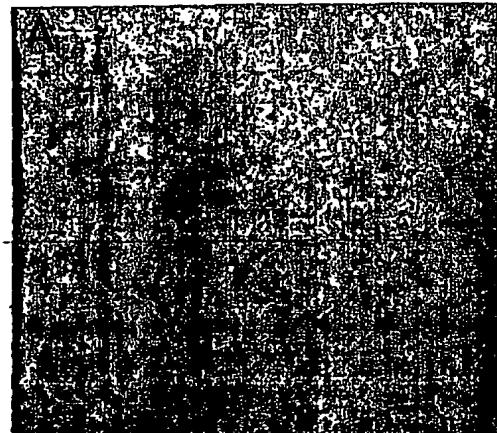


FIG. 10

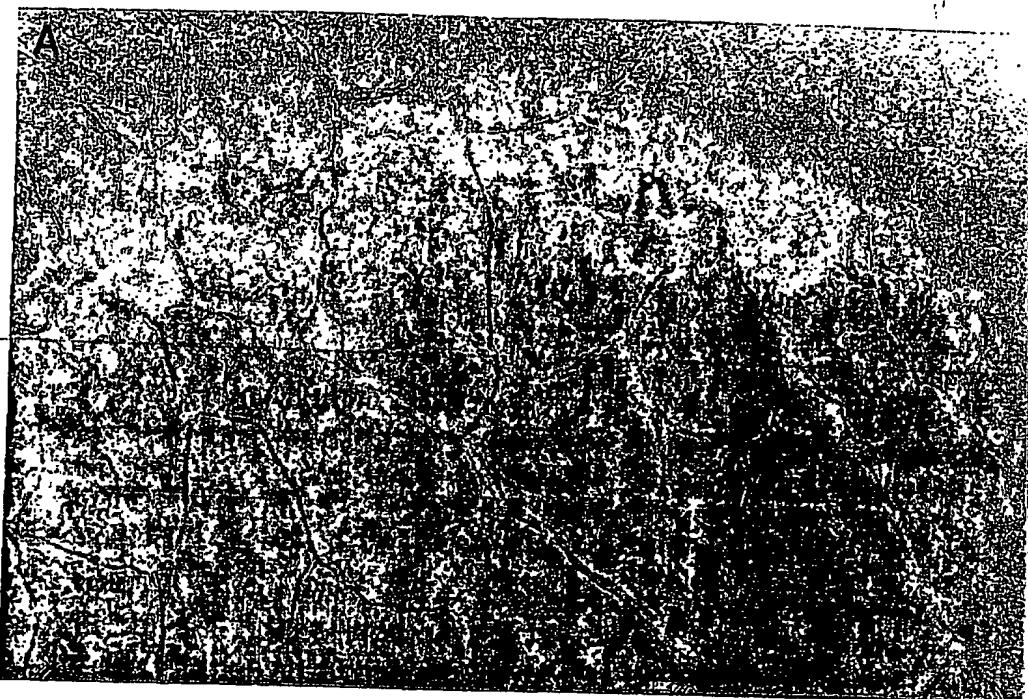


FIG. 11

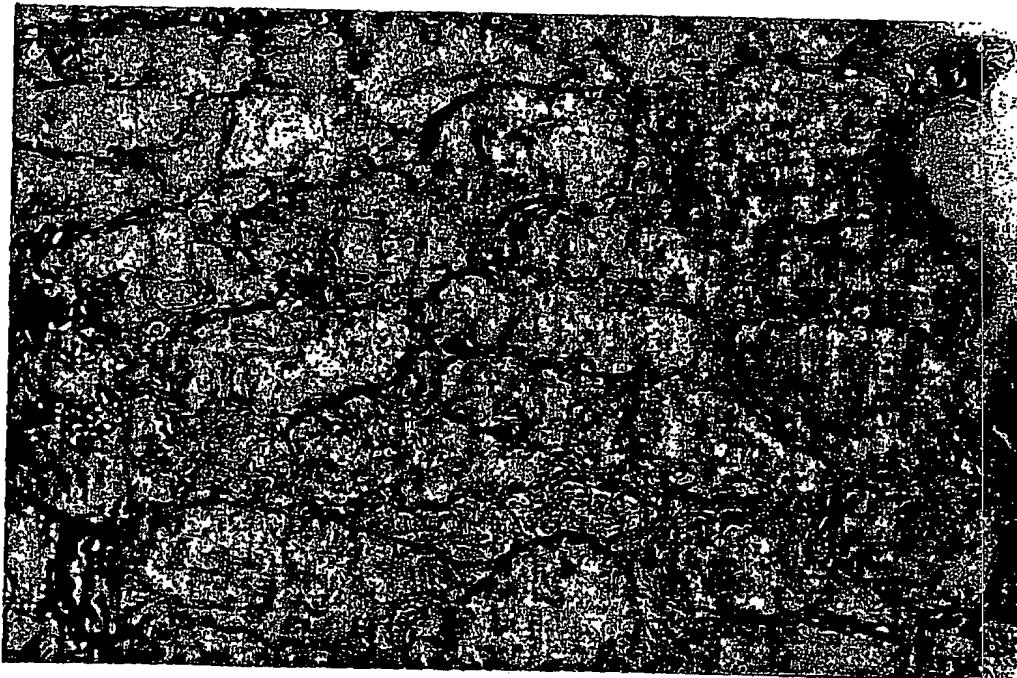
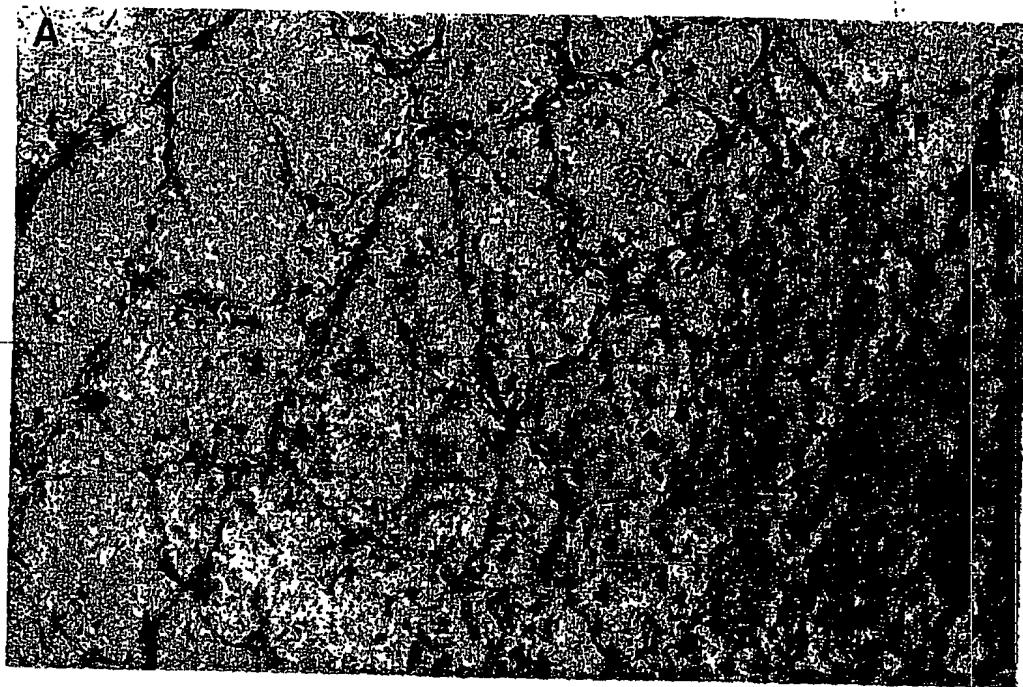


FIG. 12





FIG. 13

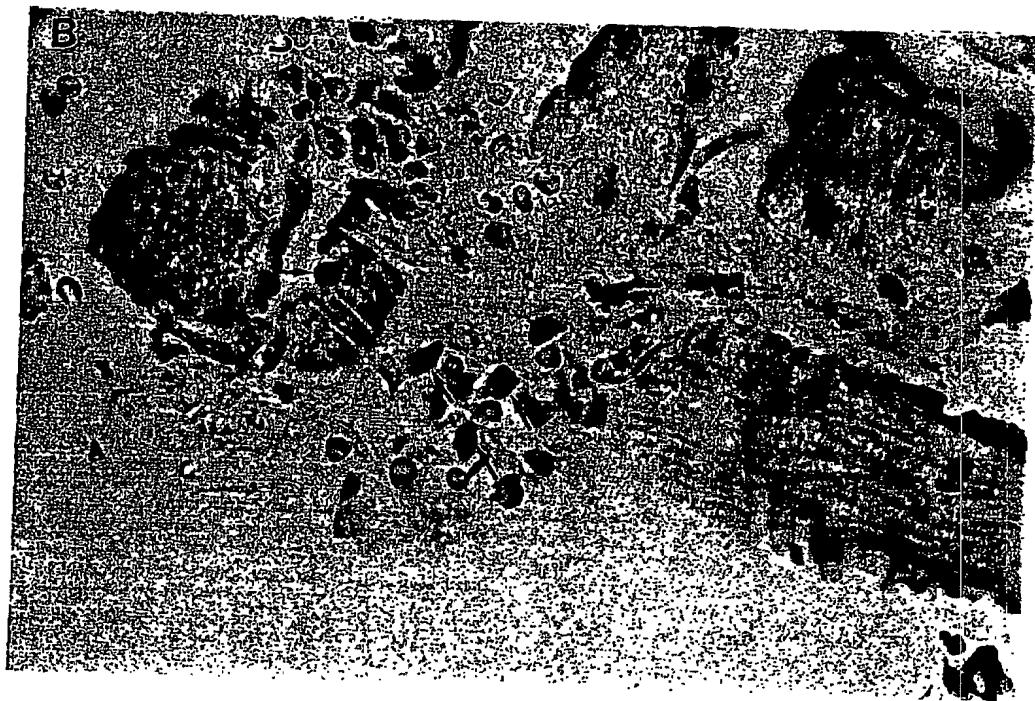
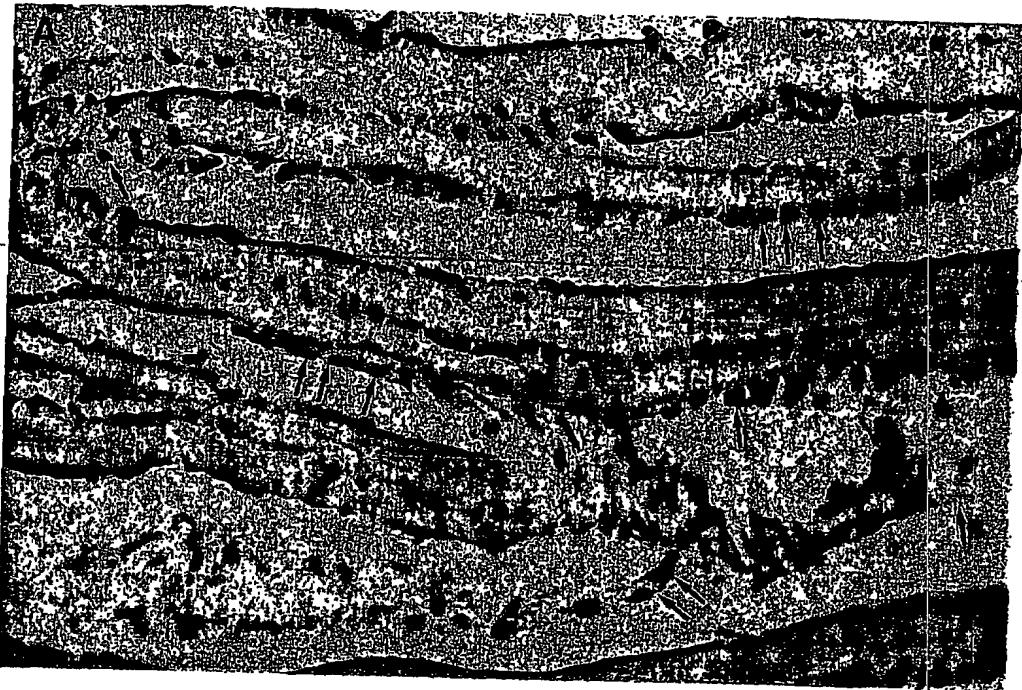


FIG. 14

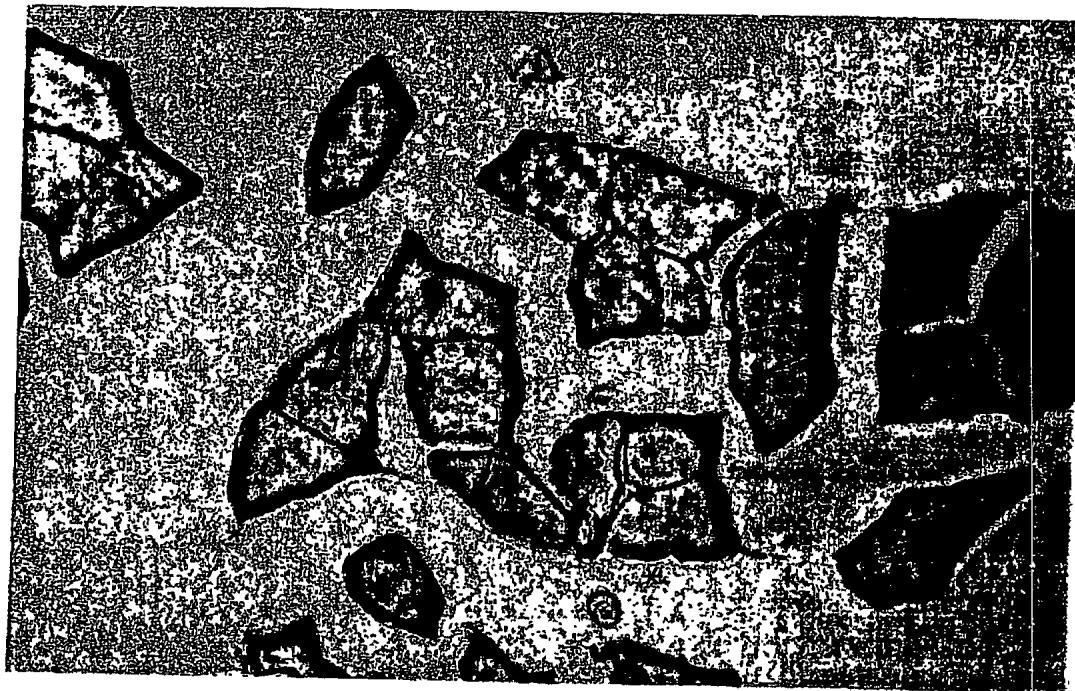


FIG. 15

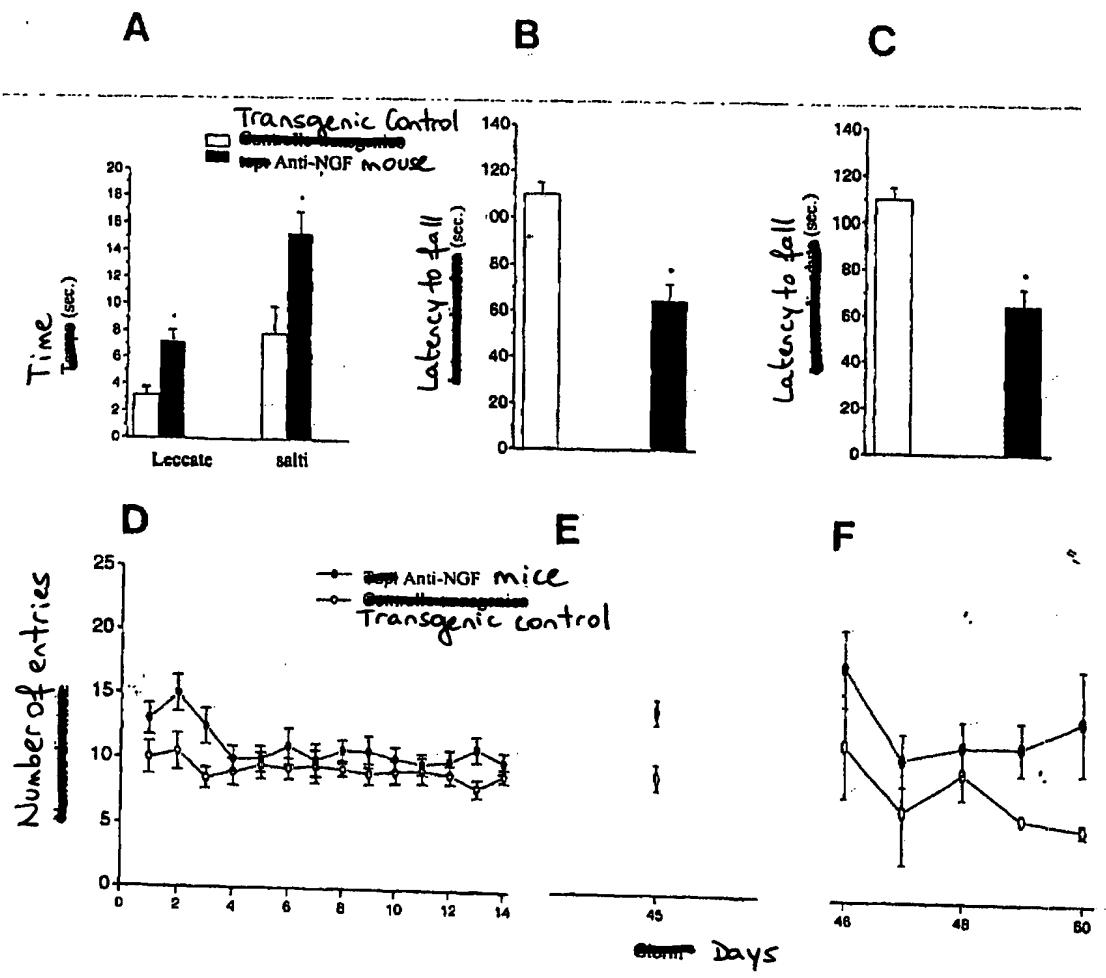
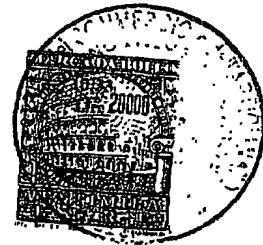


FIG. 16



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**